



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS**  
**BIOTECNOLÓGICOS**

**MARGARETE KIMIE FALBO**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE**  
**FUNGOS NEMATÓFAGOS NO CONTROLE DAS**  
**HELMINTOSES EM OVINOS NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção de grau de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof. Dra. Vanete Thomaz Soccol  
Co-orientador Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

**Curitiba**  
**2010**

**MARGARETE KIMIE FALBO**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE  
FUNGOS NEMATÓFAGOS NO CONTROLE DAS  
HELMINTOSES EM OVINOS NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Processos Biotecnológicos,  
Setor de Tecnologia, Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial a obtenção  
de grau de Doutor em Processos  
Biotecnológicos

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof. Dra. Vanete Thomaz Soccol  
Co-orientador Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

**Curitiba  
2010**

## *DEDICO*

*Aos meus pais, Walter e Margareth,  
as minhas irmãs, Gláucia e Cláudia,  
pelo amor incondicional.*

*Ao Itacir, pelo amor, carinho e  
companherismo.*

*A eles meu amor e gratidão eterna.*

*Agradecimento Especial*

*A Professora Dra. Vanete  
Thomaz Soccol por exemplificar o  
amor através da arte de ensinar.*

*“ Quando o homem aprender a  
respeitar até o menor ser da  
criação, seja animal ou vegetal,  
ninguém precisará ensiná-lo a  
amar seu semelhante”*

*(Albert Schweitzer)*

## **AGRADECIMENTOS**

A *Deus* pela Vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e Profa. Dra. Luciana Vandenberghe pelo aprendizado, pelo exemplo de dedicação, de profissionalismo, minha gratidão.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos.

Ao Centro de Microscopia da Universidade Federal do Paraná pela disponibilidade na realização de parte deste trabalho.

A todos os professores, técnicos, alunos que sempre estiveram dispostos a ensinar, auxiliar e pela amizade construída no decorrer destes anos.

A Universidade Estadual do Centro Oeste, Departamento de Medicina Veterinária, pelo apoio oferecido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos do curso de Medicina Veterinária e Agronomia da UNICENTRO que nos auxiliaram na execução deste trabalho.

A todos que de forma direta ou indireta nos ajudaram, muito obrigada!

## RESUMO

A resistência dos nematóides a vários princípios ativos é atualmente o principal entrave na produção de pequenos ruminantes. O reflexo deste problema aliado a crescente preocupação com o meio ambiente, segurança alimentar e o bem estar animal teve implicações na produção agropecuária o que impulsionou na busca por tecnologias para a implantação de sistemas de produção sustentável. Desde então, métodos alternativos para o controle da verminose têm sido propostos e devem ser utilizados de maneira integrada a outros, como por exemplo, o controle biológico. Este tem por definição utilizar populações de organismos vivos já existentes na natureza para reduzir a população de organismos nocivos tornando-o menos abundante do que era anteriormente, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais. A utilização de fungos nematófagos ou predadores, no controle biológico, tem se mostrado promissor. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar cepas nativas de fungos com atividade predatória para nematóides em solo paranaense, identificá-los, testar sua atividade contra larvas de tricostrongilídeos por testes *in vitro*, sua capacidade de sobrevivência á passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos, estudar a interação do fungo nematófago com larvas infectantes de *Haemonchus* sp utilizando como ferramenta a microscopia eletrônica de varredura, avaliar a cinética de crescimento e produção de esporos do fungo isolado, utilizando meio de cultura com resíduos agroindustriais, testar a campo o método de pulverização de conídios na pastagem no controle das nematodioses em ovinos e avaliar o possível impacto ambiental sobre nematóides de vida livre e fitonematóides no solo. Das 56 amostras de solos provenientes de várias mesorregiões do Estado do Paraná, foram isoladas duas cepas com atividade predatória: *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys conoides*. No teste *in vitro* realizado contra larvas de tricostrongilídios em placas de Petri o isolado *Arthrobotrys conoides* atingiu 96,35% de eficiência e o *Arthrobotrys musiformis* de 85,75%. No outro teste *in vitro*, realizado com a adição de diferentes concentrações de conídios, o isolado *Arthrobotrys conoides* teve eficácia contra larvas infectantes (L3) em 91% quando comparado com o *Arthrobotrys musiformis* (81%). Ambas as cepas mostraram ser resistentes a passagem pelo trato gastrointestinal em ovinos. No estudo da interação fungo e nematóide, pela microscopia eletrônica de varredura observou-se claramente todo o processo de predação desde a formação de armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais, captura, prolongamento no bulbo de infecção do fungo sugerindo ser utilizado para perfurar a cutícula do nematóide no momento da sua penetração, diminuição do turgor e a presença da hifa no interior do corpo da larva, confirmando a atividade predatória da cepa de *Arthrobotrys conoides* contra larvas infectantes de *Haemonchus* sp. No teste de cinética de crescimento, verificou-se que a velocidade de crescimento do fungo em meio contendo casca de soja foi superior ( $0,50 \text{ mm h}^{-1}$ ) quando comparado com o meio contendo farelo de trigo ( $0,45 \text{ mm h}^{-1}$ ), porém a produção de conídios em farelo de trigo foi de  $2,19 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  maior quando comparado a casca de soja ( $1,13 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). A avaliação do controle biológico foi realizada nos meses de maio a setembro de 2009, período em foi pulverizado esporos na pastagem. Os parâmetros avaliados foram contagem de larvas infectantes (L3) na pastagem; taxa de infecção de animais sentinelas monitorados pela contagem de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) e pelo número de nematóides do solo. O número de larvas de helmintos nas pastagens reduziu significativamente com média de redução em 52,4% no final do experimento quando comparado ao grupo controle, diferindo estatisticamente entre si. O ganho de peso dos animais não diferiu estatisticamente.

## ABSTRACT

Control of gastrointestinal nematodes infection in small ruminants has been a problem because of resistance of parasites to different active ingredients. The reflection of this problem coupled with growing concern about the environment, food safety and animal welfare had implications for agricultural production which has fueled the search for technologies for the implementation of sustainable production systems. Since then, alternative methods to control the worms have been proposed and should be used in an integrated manner to other methods, such as biological control, which is defined using populations of living organisms already existing in nature, to reduce the population of pests, making it less abundant than previously, reducing the source of infection for the final host. The use of nematophagous fungi as biological control has shown promise. The objective this work was to isolate native strains of nematophagous fungi in soils from Paraná, identify them, test their predatory activity in vitro against larvae trichostrongyles, their ability to survive passage through the gastrointestinal tract of sheep, to study the interaction of the nematophagous fungus larvae infective *Haemonchus* sp using the tool with scanning electron microscopy to evaluate the kinetics of growth and sporulation of the fungus *Arthrobotrys conoides* using culture medium with agro-industrial residues, field test the method of spraying conidia on pasture in nematodiosis control in sheep and to evaluate the possible environmental impact on free-living nematodes and phytonematodes in soil. Of the 56 soil samples from various regions of Paraná, were isolated from two strains with predatory activity: *Arthrobotrys musiformis* and *Arthrobotrys conoides*. In vitro tests conducted against larvae in Petri dishes trichostrongyles isolate *Arthrobotrys conoides* reached 96.35% efficiency and *Arthrobotrys musiformis* of 85.75%. In another in vitro test performed with the addition of different concentrations of conidial isolate *Arthrobotrys conoides* reduced 91% of infective larvae (L3) when compared with *Arthrobotry smusiformis* (81%). Both strains were shown to be resistant to passage through the gastrointestinal tract in sheep. In the study of fungus x nematode interaction, using as tool the scanning electron microscopy made it possible to clearly observe the entire process from the predation of formations traps dimensional adhesive networks, capture, extending the bulb of the fungus suggests be used to drill the cuticle of the nematode in the moment of penetration of the fungus, decreased turgor and the presence of hyphae inside the body of the larva, confirming the strain of the predatory activity of *Arthrobotrys conoides* against infective larvae of *Haemonchus* sp. In the kinetic test, we used the culture media prepared with 5% for the two residues tested, wheat bran and soybean hulls plus 1.5% agar L<sup>-1</sup> and found that the speed of fungal growth on medium containing soybean hulls was higher (0.50 mm h<sup>-1</sup>) compared with the medium containing wheat bran (0.45 mm h<sup>-1</sup>), however the production of conidia on wheat bran was 2.19 x 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> higher compared to soybean hulls. The evaluation of biological control was carried out between May to September 2009, period in which spores were sprayed on pasture. The parameters were counting of infective larvae (L3) on pasture; rate of infection of sentinel animals monitored by counting eggs per gram faeces (OPG) and the number of soil nematodes. The number of nematodes larvae in pastures significantly decreased in May, July and August, with a mean reduction of 52.4% at the end of the experiment compared with the control group, differences among them. We observed the largest reductions in FEC in July (51.4%) and August (56.4%), leaving the overall average in 49.1% when compared to control. The weight gain of animals did not differ statistically.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>2. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 PRINCIPAIS PARASITOS EM PEQUENOS RUMINANTES .....	18
2.2 ASPECTOS IMPORTANTES NA EPIDEMIOLOGIA DAS HELMINTOSES EM PEQUENOS RUMINANTES .....	20
2.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DAS HELMINTOSES EM PEQUENOS RUMINANTES .....	23
2.3.1 Tratamento Seletivo Alvo ou Cinco Pontos de Checagem (5.√ <sup>©</sup> ) .....	23
2.3.2 Taninos .....	26
2.3.3 Imunonutrição .....	27
2.3.4 Manejo de Pastagem .....	28
2.3.5 Controle Biológico .....	29
2.3.5.1 Fungos nematófagos .....	29
2.3.5.2 Principais fungos nematófagos utilizados na saúde animal e método de aplicação .....	31
2.4. REFERÊNCIAS.....	37
<b>3. CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NO ESTADO DO PARANÁ PARA UTILIZAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓDEOS.....</b>	<b>51</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	53
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.2.1 Amostras de Solo.....	54
3.2.2 Larvas de Nematódeos de Vida Livre Utilizadas no Isolamento.....	55
3.2.3 Isolamento e Identificação de Fungos Nematófagos.....	56
3.2.3.1 Identificação morfológica dos isolados.....	57
3.2.3.2 Identificação do fungo isolado pela análise molecular da região do espaço interno transcrito (ITS) do gene rDNA.....	57
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.4 CONCLUSÕES .....	66
3.5 REFERÊNCIAS.....	67

<b>4. CAPÍTULO 3 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO FUNGO <i>Arthrobotrys conoides</i> EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....</b>	<b>71</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	73
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	74
4.2.1 Cepa do Fungo <i>Arthrobotrys conoides</i> .....	74
4.2.2 Resíduos Agroindustriais .....	74
4.2.3 Preparo dos Meios de Cultura.....	75
4.2.4 Cinética de Crescimento .....	75
4.2.5 Quantificação de Conídios.....	76
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.4 CONCLUSÕES.....	80
4.5 REFERÊNCIAS .....	81
 <b>5. CAPÍTULO 4 - ATIVIDADE PREDATÓRIA DE CEPAS NATIVAS DO FUNGO <i>Arthrobotrys conoides</i> e <i>Arthrobotrys musiformis</i> CONTRA LARVAS INFECTANTES DE TRICOSTRONGILÍDEOS APÓS TESTE DE PASSAGEM PELO TRATO GASTRINTESTINAL EM OVINOS .....</b>	<b>83</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	85
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	86
5.2.1 Produção de Conídios para o Teste de Passagem pelo Trato Gastrointestinal de Ovinos e Testes <i>in vitro</i> .....	86
5.2.2 Animais.....	86
5.2.3 Teste de Passagem pelo Trato Gastrointestinal.....	87
5.2.4 Teste <i>in vitro</i> das Cepas <i>Arthrobotrys conoides</i> e <i>Arthrobotrys musiformis</i> Após Passagem pelo Trato Gastrointestinal.....	87
5.2.4.1 Teste <i>in vitro</i> em placas de Petri.....	88
5.2.4.2 Teste <i>in vitro</i> realizado em coproculturas com adição de conídios em diferentes concentrações.....	90
5.2.5 Análise Estatística.....	91
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
5.4 CONCLUSÕES.....	97
5.5 REFERÊNCIAS.....	98

<b>6. CAPÍTULO 5 - ESTUDO DA ATIVIDADE PREDATÓRIA DO FUNGO <i>ARTHROBOTRYS CONOIDES</i> SOBRE LARVAS INFECTANTES DE <i>HAEMONCHUS</i> SP UTILIZANDO COMO FERRAMENTA A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....</b>	<b>101</b>
6.1 INTRODUÇÃO.....	103
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	104
6.2.1 Obtenção das Larvas Infectantes de <i>Haemonchus</i> sp.....	104
6.2.2 Microscopia Eletrônica Varredura (MEV).....	104
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
6.4 CONCLUSÃO.....	110
6.5 REFERÊNCIAS.....	111
 <b>7. CAPÍTULO 6 - EFEITO DA PULVERIZAÇÃO NA PASTAGEM DE CONÍDIOS DE <i>Arthrobotrys conoides</i> NO CONTROLE DA VERMINOSE EM OVINOS.....</b>	 <b>114</b>
7.1 INTRODUÇÃO.....	116
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	118
7.2.1 Cepa do Fungo <i>Arthrobotrys conoides</i> .....	118
7.2.2 Produção de Conídios para o Teste de Campo.....	118
7.2.3 Local do Experimento.....	119
7.2.4 Animais.....	120
7.2.5 Contagem de Ovos de Helminhos por Grama de Fezes (OPG), FAMACHA® e Ganho Médio de Peso.....	120
7.2.6 Colheita de Pastagem para Recuperação e Contagem de Larvas Infectantes de Tricostrogilídios por Quilo de Matéria Seca.....	121
7.2.7 Coleta de Amostras de Solo.....	122
7.2.8 Extração, Quantificação e Classificação dos Nematóides do Solo.....	122
7.2.9 Índices Climáticos.....	122
7.2.10 Análise Estatística.....	123
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
7.4 CONCLUSÕES.....	134
7.5 REFERÊNCIAS.....	135
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>141</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Cartão utilizado para avaliação do 5.√ <sup>©</sup> .....	26
--	----

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Mesoregiões e quantidade de amostras de solo coletadas no Estado do Paraná .....	54
FIGURA 2 - Foto mostrando uma forma de isolamento de fungos de amostras de solo em placas de Petri contendo ágar-água 2%.....	57
FIGURA 3 - Fotomicrografia de fungos isolados do solo em ágar-água 2% mostrando A atividade predatória contra nematóides de vida livre do gênero <i>Panagrellus</i> sp. (A) Fungo isolado com armadilha do tipo anel não constritor; (B) Fungo isolado com armadilhas em colunas; (C) Fungo isolado com armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais; (D) Fungo isolado com armadilhas do tipo redes adesivas bidimensionais.....	60
FIGURA 4 - Fotomicrografia mostrando os (A) conidióforos e (B) conídios do fungo nematófago CED corado em azul de algodão.....	62
FIGURA 5 - Fotomicrografia mostrando as armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais da cepa de fungo CED corado em azul de algodão.....	63
FIGURA 6 - Produtos amplificados por PCR com os iniciadores V9G e LS266 CN: Controle negativo de amplificação; CE: Controle negativo de extração do DNA; CED: cepa isolada com DNA nas concentrações de 100 ng e 50 ng; MM: Marcador de Massa Molecular (1Kb).....	64

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Substratos utilizados. (A) – Farelo trigo e (B) – Casca de soja.....	75
FIGURA 2 - Representação gráfica do crescimento linear do fungo <i>A. conoides</i> /CED em meio de cultura com Agar 1.5% com Farelo trigo e Agar 1.5% com casca de soja a 5% .....	77
FIGURA 3 - Representação gráfica do crescimento por área do fungo <i>A. conoides</i> /CED em meio de cultura com Agar 1.5% com Farelo trigo e Agar 1.5% com casca de soja a 5% .....	77
FIGURA 4 - Características macroscópicas observadas do crescimento do fungo <i>Arthrobotrys conoides</i> cultivados em meio de cultura contendo (A) 5% casca de soja com 1,5% de ágar e (B) 5% de farelo trigo e 1,5% de Ágar.....	79

## CAPÍTULO 4

FIGURA 1-	Representação gráfica da atividade predatória, da cepa <i>Arthrobotrys conoides</i> em teste <i>in vitro</i> realizado em coproculturas com diferentes concentrações de conídios após sete dias de incubação a 28 °C.....	95
FIGURA 2-	Representação gráfica da atividade predatória, da cepa <i>Arthrobotrys musiformis</i> em teste <i>in vitro</i> realizado em coproculturas com diferentes concentrações de conídios após sete dias de incubação a 28 °C.....	96

## CAPÍTULO 5

FIGURA 1-	Microscopia eletrônica de varredura do processo de formação de armadilhas e interação do fungo nematófago <i>Arthrobotrys conoides</i> com larvas infectantes (L3) de <i>Haemonchus</i> sp em superfície de membrana de diálise.....	107
FIGURA 2	Microscopia eletrônica de varredura do processo de formação de armadilhas e interação do fungo nematófago <i>Arthrobotrys conoides</i> com larvas infectantes (L3) de <i>Haemonchus</i> sp em superfície de membrana de diálise.....	108

## CAPÍTULO 6

FIGURA 1-	Representação gráfica do balanço hídrico sequencial de cada intervalo de 10 dias, durante o ano de 2009 em Guarapuava, PR.....	123
FIGURA 2-	Representação gráfica da temperatura máxima e mínima durante o período do experimento, de Maio a Setembro de 2009, em Guarapuava-PR .....	124
FIGURA 3-	Número de larvas infectantes de tricostrongilídeos na pastagem (L3), número de ovos por grama de fezes e variação temperatura ao longo do experimento .....	125

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Número de amostras de solo coletadas nas mesorregiões e municípios do Estado do Paraná e tipo de sistema de produção adotado nos locais de coleta.....	55
---	----

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Velocidade comparada do crescimento radial (mm/h) do fungo nematófago <i>Arthrobotrys conoides</i> cultivados em meio contendo farelo de trigo (5%) com Ágar a (1,5%) e casca de soja (5%) com ágar (1,5%) a 26 °C durante 144 horas.....	78
--	----

### CAPÍTULO 4

TABELA 1 - Valores médios do número de larvas infectantes de trichostrongilídeos (L3) recuperadas pelo método de Baermann após seis dias de incubação no teste <i>in vitro</i> realizados em placas de Petri com os fungos <i>Arthrobotrys conoides</i> e <i>Arthrobotrys musiformis</i> após passagem pelo trato gastrointestinal e percentagem de redução em relação ao controle.....	93
TABELA 2 - Número e percentagem de larvas infectantes (L3) de <i>Haemonchus</i> sp, <i>Trichostrongylus</i> sp e <i>Strongyloides papillosus</i> recuperadas no teste <i>in vitro</i> realizado em placas de Petri após passagem pelo trato gastrointestinal no início (dia zero) e seis dias após inoculação.....	93
TABELA 3 - Atividade predatória <i>in vitro</i> realizada em coproculturas com diferentes concentrações de conídios das cepas <i>Arthrobotrys conoides</i> e <i>Arthrobotrys musiformis</i> , representadas em número de larvas infectantes de trichostrongilídeos recuperadas pelo método de Baermann e percentagem de redução após sete dias de incubação a 28 °C.....	95

### CAPÍTULO 6

TABELA 1 - Número total de larvas infectantes (L3) de nematódeos gastrintestinais de ovinos presentes na pastagem por Kg de Matéria Seca (M.S) do grupo 1 (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo 2 (pastagem com pulverização de conídios do <i>A. conoides</i> ) durante o período de maio a setembro de 2009, em Guarapuava-PR.....	127
--	-----

TABELA 2 - Contagem de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo 1 (animais em pastagem sem pulverização de conídios) e grupo 2 (animais em pastagem com pulverização de conídios do <i>A. conoides</i> e percentagem de redução do grupo 2 em relação ao grupo 1 .....	128
TABELA 3 - Média das avaliações pelo método Famacha® realizados nos animais pertencentes ao Grupo 1 (pastagem sem pulverização de conídios ) e Grupo 2 (pastagem com pulverização de conídios <i>A. conoides</i> ) no período de Agosto a outubro de 2009 .....	129
TABELA 4 - Peso vivo inicial, final e ganho médio diário (GMD), dos animais pertencentes ao grupo 1 (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo 2 (pastagem com pulverização de conídios do <i>A. conoides</i> ) .....	131
TABELA 5 - Número de fitonematóides por metro quadrado de solo dos piquetes do grupo 1 (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo 2 (pastagem com pulverização de conídios do <i>A. conoides</i> ) durante o período de maio a outubro de 2009, em Guarapuava-PR .....	132
TABELA 6 - Número de nematóides de vida livre por metro quadrado de solo dos piquetes do grupo 1 (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo 2 (pastagem com pulverização de conídios do <i>A. conoides</i> ) durante o período de maio a outubro de 2009, em Guarapuava-PR .....	132

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Tradicionalmente o controle da verminose em ruminantes é realizado com a utilização de anti-helmínticos administrados em todo o rebanho. Entretanto, as múltiplas dosificações durante o ano, alternância de princípios ativos, sem considerar a epidemiologia para cada região e as subdosagens ocasionou o grande problema enfrentado no mundo todo: a resistência dos parasitos aos princípios ativos. A resistência vem ocorrendo em especial em pequenos ruminantes, e mais recentemente em bovinos (POMROY, 2006; SUAREZ & CRISTEL, 2007).

Além da resistência aos anti-helmínticos, outro fator preocupante é a questão ambiental. No Brasil, estima-se que 15 toneladas da lactona macrocíclica sejam lançadas ao meio ambiente pelas fezes, pois é utilizada em aproximadamente 200 mil animais por mês, tendo-se uma idéia do impacto provocado no solo e bacias hidrográficas (MOLENTO et al., 2004b). O reflexo destes problemas aliado a crescente preocupação com a segurança alimentar e o bem estar animal teve implicações na produção agropecuária, o que resultou na busca por tecnologias para a implantação de sistemas de produção sustentável (WALLER, 1997; LARSEN, 2000; WALLER, et al. 2006). Como resposta a essa demanda por produtos de origem animal sem resíduos químicos, há um aumento no número de propriedades agroecológicas em todo mundo. No Brasil, segundo Ahrens (2006) há 370 mil propriedades agroecológicas.

O controle da verminose em pequenos ruminantes realizado com o tratamento químico como o não químico nunca será sustentável se utilizado sozinho (WALLER, 2006), pois a plasticidade biológica que o nematóide demonstrou em sobreviver a um agente de pressão seletiva (anti-helmínticos) é uma clara demonstração de que poderiam realizar o mesmo com qualquer outro princípio ativo ou qualquer outro método de controle. Hoje sabemos que o controle químico supressivo deve ser evitado. Infelizmente só nos alertamos quando o



problema já era uma realidade amplamente disseminada. Técnicos da área de produção animal precisam considerar o controle da verminose dentro deste contexto de sustentabilidade.

Os métodos alternativos para o controle da verminose têm sido propostos e devem ser utilizados de maneira integrada a outros métodos, com o próprio tratamento químico. Ao contrário do modo de ação dos anti-helmínticos, esses novos métodos não têm ação direta sobre a infecção parasitária nos hospedeiros. Tem como propósito, por exemplo, melhorar a imunidade dos hospedeiros, ou diminuir a exposição dos hospedeiros ao parasito, de modo que a infecção parasitária fique abaixo do limiar econômico (KETZIS et al., 2006), o que permite também manter uma população de parasitos em refúgio para garantir a permanência de alelos susceptíveis aos anti-helmínticos (SOULSBY, 2007).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo isolar, identificar fungos nematófagos no Estado do Paraná, testá-los quanto a resistência a passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos, estudar a atividade predatória contra larvas infectantes de trichostrongilídeos em testes *in vitro*, estudar a interação do fungo com larvas de *Haemonchus* sp utilizando como ferramenta a microscopia eletrônica de varredura, selecionar cepas para teste de campo e testar a campo aquela com maior eficácia visando o controle biológico das nematodioses em ovinos.

O trabalho, aqui apresentado, foi dividido em seis capítulos. O primeiro trata-se da revisão bibliográfica onde serão abordados os principais parasitos em pequenos ruminantes, os principais aspectos na epidemiologia da verminose e alguns novos métodos utilizados como alternativas no controle da verminose. O segundo capítulo consta da parte experimental relativa aos isolamentos e identificação de fungos nematófagos em amostras de solo no Estado do Paraná. O terceiro trata da cinética de crescimento do isolado em resíduos agroindustriais e produção de esporos. O quarto capítulo aborda o teste de passagem pelo trato gastrintestinal dos isolados e avaliação *in vitro* da atividade predatória. O quinto é referente ao

estudo por meio da microscopia eletrônica de varredura, da interação entre larvas infectantes de *Haemonchus* sp com o fungo nematófago. E, o sexto trata-se da aplicação de esporos na pastagem e do seu efeito no controle da verminose em cordeiros.

## CAPÍTULO 1

### 2. REVISÃO DE LITERATURA

O Estado do Paraná possui 579 mil cabeças de ovinos, sendo a região Sul detentora do maior número de ovinos, com destaque para o município de Guarapuava (IBGE, 2008). Segundo Silva (2004), o Paraná se caracteriza pela exploração de cordeiros para abate, oriundos de criações de pequeno e médio porte. O plantel de ovinos é de elevado padrão genético, porém resente-se da ausência de sistema de produção definido, e manejo reprodutivo adequados e falta definição de controle sanitário às condições de clima, solo e topografia.

Os problemas sanitários aliados a baixa tecnologia empregada nas propriedades rurais caracteriza a produção no Brasil como de subsistência com baixos índices de produtividade (COUTO, 2003; VIDAL et al., 2006; VIANA et al., 2007; SORIO et al., 2008). Dentre os problemas sanitários, as helmintoses gastrintestinais são reconhecidas mundialmente por ser o principal entrave na produção de pequenos ruminantes (MCLEOD, 1995; PERRY et al., 2002), devido principalmente a resistência dos nematóides a vários princípios ativos.

Para promover um controle das helmintíases gastrintestinais de ruminantes é necessário conhecer os principais parasitos, sua epidemiologia, os aspectos clínicos que provocam nos animais e outros métodos de controle possíveis de serem adotados.

#### 2.1 PRINCIPAIS PARASITOS EM PEQUENOS RUMINANTES

Os principais nematóides de maior patogenicidade causadores de grande impacto econômico na ovinocaprinocultura pertencem a Família Trichostrongylidae, e aos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Ostertagia* (Teladorsagia) e *Nematodirus*,

responsáveis por prejuízos econômicos em diversos países de clima tropical e temperado (BAKER, 1996).

Esses parasitos estão associados a perdas produtivas em ruminantes com baixo aproveitamento nutricional, redução da conversão alimentar, reduzido ganho ponderal, déficit na produção de carne, lã e leite (MCLURE, 2000).

A espécie *Haemonchus contortus*, parasito do abomaso, é considerada a espécie mais patogênica e prevalente em todo território nacional (AMARANTE, 2004) e em países de clima tropical e sub-tropical (VLASSOF et al., 2001). A patogenia da haemoncose é essencialmente consequência do hematofagismo realizado pelo parasito, e pode ser classificada em três formas de apresentação: hiperaguda, que ocorre em infecções maciças, onde pode ocorrer morte súbita por gastrite hemorrágica intensa; a forma aguda ocasiona anemia evidente, com queda progressiva no hematócrito e a crônica, que se caracteriza por apresentar perda de peso progressiva como consequência da ação espoliativa provocada pelo helminto, com diminuição na absorção de nutrientes (RADOSTISTS, 2002).

Outra espécie de importante impacto econômico é o *Trichostrongylus colubriformis*. Moraes et al. (1998) e Oliveira et al. (1999) constataram que este parasito apresenta maior prevalência que o *H. contortus* em algumas regiões do Paraná, porém a maior patogenicidade do *Haemonchus* torna-o mais importante. No desenvolvimento do seu ciclo evolutivo, estes parasitos rompem a mucosa duodenal, provocando edema, exsudação e hemorragia. As vilosidades intestinais tornam-se achatadas e sinuosas, diminuindo a superfície de absorção (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003). As lesões limitam-se ao intestino delgado anterior e sua gravidade é determinada pela quantidade de parasitos (RADOSTITS et al., 2002). Os principais sinais clínicos da trichostrongilose são diarreia e diminuição do crescimento em decorrência da baixa deposição de proteína, gordura, cálcio e fósforo (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003).

Segundo Amarante (2010) os gêneros *Ostertagia* e *Nematodirus* apresentam importância na região Sul do País. No estado do Paraná, na região de Guarapuava, Oliveira et al. (1999) observaram níveis patogênicos desses parasitos em ovinos no final do verão e no início da primavera. Os sinais clínicos apresentados incluem perda de peso, diarreia e inapetência (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003). O gênero *Nematodirus*, tem como espécie de maior prevalência o *Nematodirus spathiger* tanto no Rio Grande do Sul (SANTIAGO et al., 1976; ECHEVARRIA, 1996) quanto no Paraná (MORAES et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999), além da ocorrência das espécies *N. battus* e *N. filicollis*, os quais não mostram importância epidemiológica pois aparentemente ovinos adultos são imunes a estas espécies. Desta forma, a transmissão é realizada de cordeiro a cordeiro e observa-se apenas uma geração anual (SANTIAGO et al., 1976). Provocam diarreia em infestações maciças em consequência da lesão na mucosa intestinal com posterior atrofia das vilosidades (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003).

Geralmente as infecções ocasionadas por esses nematóides ocorrem simultaneamente, sendo os casos de mortalidade relativamente comuns, devido ao baixo consumo de alimentos, problemas relacionados a digestão e absorção, acarretando redução na produtividade dos animais (JACKSON et al., 2009) com perdas estimadas no Reino Unido por Nieuwhof & Bishop (2005) em £ 84 milhões.

## 2.2 ASPECTOS IMPORTANTES NA EPIDEMIOLOGIA DAS HELMINTOSES EM PEQUENOS RUMINANTES

O conhecimento da epidemiologia regional ou até mesmo local é um pré-requisito para o controle integrado das nematodioses. Fatores relacionados ao parasito, ao hospedeiro e ao ambiente estão estritamente inter-relacionados no controle da doença (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008).

Os nematódeos da Família Trichostrongylidae apresentam ciclo exógeno direto. O hospedeiro infectado elimina ovos morulados com as fezes, e no ambiente há o desenvolvimento da larva de primeiro estágio com subsequente desenvolvimento em larvas do segundo e terceiro estágio. O animal se infecta de forma passiva, por ingestão das larvas infectantes (URQUHART et al., 1998).

Segundo Bianchin & Melo (1985) as larvas infectantes (L3) dos helmintos, em pastagens nativas ou cultivadas, têm a sua sobrevivência e manutenção controladas por condições climáticas, com maior contaminação nos períodos de maior precipitação pluviométrica e menor contaminação nos períodos de baixa precipitação. Porém, Amarante et al. (1996) observaram que épocas de estiagem não influenciaram negativamente no desenvolvimento, na sobrevivência e na dinâmica da dispersão larval.

A velocidade de desenvolvimento das larvas depende da temperatura e umidade, sendo a faixa entre 18 °C a 26 °C e umidade de 100% a ideal para o desenvolvimento da quantidade máxima de larvas em menor tempo possível. Entretanto, mesmo com baixa umidade relativa do ar pode ocorrer desenvolvimento larval contínuo, se nas fezes ou no solo houver um microclima suficientemente úmido (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003).

Conforme a espécie do nematódeo, a média de sobrevivência das larvas infectantes (L3) no meio ambiente varia de 6 a 18 meses. Entretanto, as L3 são susceptíveis a seca prolongada e ao frio intenso (O' CONNOR et al., 2006), sendo as larvas infectantes das espécies *Trichostrongylus* sp, *Ostertagia* spp, *Cooperia* spp. e *Nematodirus* spp., mais resistentes á temperatura mais baixa do que a exigida pelo *Haemonchus* sp (RADOSTITS et al., 2002). Porém, estudos realizados por Amarante e Barbosa (1998) na região de Botucatu-SP, não encontraram diferença na prevalência, durante o ano, entre os gêneros *Haemonchus* e *Trichostrongylus*.

Segundo Hoste et al. (2007), os caprinos são mais afetados que ovinos, provavelmente pela menor capacidade de desenvolver uma resposta imune contra nematóides, embora sob condições de pastejo os ovinos são mais infectados que os caprinos, devido ao comportamento alimentar dos ovinos expondo-os a um maior contato com as larvas infectantes.

Estudos realizados com pequenos ruminantes indicam que geralmente um pequeno número de animais são maciçamente infectados (SRÉTER et al., 1994). Fatores como idade do hospedeiro, raça, características genéticas individuais, estado nutricional e fisiológico explicam porque alguns animais são mais capazes do que outros para limitar a população de helmintos e modular a biologia do parasito (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008).

Segundo Amarante (2010), os animais até a puberdade apresentam grande susceptibilidade a verminose, com graus de infecção variável dependendo da intensidade da contaminação das pastagens e das condições de manejo.

O estado fisiológico do peri-parto, tornam as ovelhas mais susceptíveis as infecções por nematódeos gastrintestinais o que provoca um aumento no número de ovos eliminados nas fezes com conseqüente aumento na contaminação das pastagens (BARGER, 1996 citado por BAILEY et al. 2009). O fenômeno do peri-parto é devido ao aumento na fecundidade dos vermes adultos, à retomada do desenvolvimento de larvas hipobióticas e ao estabelecimento de novas larvas infectantes, acarretando aumento na carga parasitária de helmintos adultos (O'SULLIVAN & DONALD, 1970).

Outro fator de grande influência no desenvolvimento e nas conseqüências da verminose é a alimentação. Uma alimentação de boa qualidade permite ao animal apresentar um aumento na habilidade para enfrentar as conseqüências da infecção e ainda podem apresentar aumento na resistência limitando o estabelecimento de larvas infectantes, o

desenvolvimento e a fecundidade dos nematódeos ou, até mesmo, causando a eliminação dos parasitos já estabelecidos no aparelho digestório (AMARANTE, 2010).

Segundo Torres-Acosta & Hoste (2008), há dois pontos no ciclo biológico dos trichostrongilídeos que podemos interferir que são: nos hospedeiros, melhorando sua resistência, resiliência ou ainda, diminuindo a carga parasitária, e, no ambiente, diminuindo a quantidade de L3 na pastagem.

Desta forma, vários métodos alternativos têm sido propostos tendo como base esses dois pontos de interferência no ciclo biológico na tentativa de diminuir a utilização de anti-helmínticos, aumentando ou mantendo uma população de parasitos em refugia para preservar os genes susceptíveis, diminuindo a velocidade do desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos, reduzindo a pressão de seleção sobre os nematódeos resistentes e desta forma preservar por mais tempo a utilização dos anti-helmínticos (VAN WYK, 2001; VAN WYK et al., 2006).

## 2.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DAS HELMINTOSES EM PEQUENOS RUMINANTES

### 2.3.1 Tratamento seletivo alvo (TST) ou Cinco pontos de checagem (5.√<sup>©</sup>)

É um método proposto recentemente por Bath & Van Wyk (2009) que tem como objetivo identificar os animais que necessitam de tratamento com base em cinco sinais clínicos, por esta razão é denominado de “Five points check – 5.√<sup>©</sup>”(Figura 1), e correlacioná-los com as possíveis causas de infecção parasitária. Os pontos que devem ser checados no 5.√<sup>©</sup> no animal são:

1. Nariz, onde deverá ser observada a presença de secreção nasal que poderá sugerir infecção por *Oestrus ovis*;




2. Mucosa ocular, pelo método FAMACHA<sup>®</sup>, para se determinar os graus de anemia sugerindo infecção por *Haemonchus* sp;
3. Edema submandibular sinal clínico característico da hipoproteïnemia que pode ser ocasionado por parasitos hematófagos, utilizados principalmente naqueles animais que não apresentam anemia severa. A combinação dos dois métodos Famacha e edema são úteis no diagnóstico de parasitos hematófagos;
4. Escore corporal- é um sinal clínico que reflete o equilíbrio entre a qualidade nutricional e a demanda necessária para estado fisiológico em que o animal se encontra (crescimento, prenhez e lactação). Portanto, quando a condição corporal dentro de um grupo homogêneo varia mais do que uma unidade, em uma escala de cinco unidades, essa diferença poderá ser atribuída a outros fatores como parasitismo, o que dentro de um rebanho geralmente passa despercebido (BARGER, 1985 citado por BATH & van WYK, 2009). Porém, para que seja útil na avaliação do TST, o escore corporal deve ser avaliado por pessoas treinadas.
5. Escore diarreia – Alguns parasitos causam diarreia, sendo primariamente responsáveis pela diminuição do escore corporal. Assim, como nos outros pontos acima descritos, a diarreia pode ter várias causas, mas o parasitismo é considerado a principal. Somente os animais que mostrarem sinais de diarreia evidente serão vermifugados.

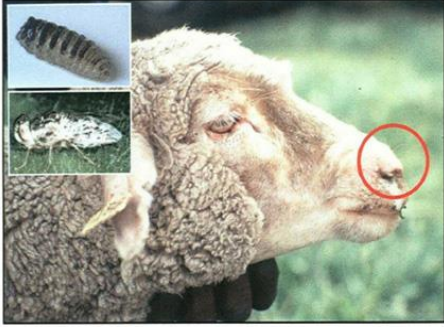
Espera-se com a introdução deste novo método haja redução na utilização de anti-helmínticos, aumentando os intervalos entre os tratamentos e desta forma, manter uma população de parasitos em refugia. A expectativa segundo os autores é muito boa, por ser um método simples, de fácil aplicabilidade, pois necessita de pouco treinamento, é barato e eficaz para pequenos ruminantes (BATH & VAN WYK, 2009; KENYON et al. 2009).

## Score cards for 5√

**FAMACHA®**  
 2007  
 Anaemia guide  
 Guide sur l'anémie  
 Guia de anemia  
 مرشد فقر الدم  
 ऐनिमिया संघर्ष निर्देश  
 貧血症檢測卡




A(1) B(2) C(3) D(4) E(5)



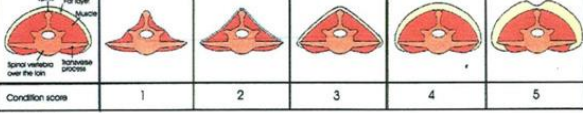
**DAG SCORECARD**

0	No faecal soiling at all No indication for treatment / action	✓
1	Very slight soiling on edge of tail / on each side No treatment / action needed	✓
2	Slight soiling on edge of tail and on each side Usually no treatment / action needed	✓
3	Moderate soiling of tail and wool Dag formation Consider treatment / action	?
4	Severe soiling extending far into the wool Severe dag formation Treatment / crutching recommended	!
5	Very severe, watery diarrhea extending to the hocks Treatment and crutching essential	☠



**Condition Scoring in Sheep**

	Individually clearly felt, sharp, obvious	Form a smooth line with deep undulations	Only slightly detectable undulations	Only detectable with firm pressure	Not detectable
Spines					
Transverse processes	Fingers easily pass underneath	Smooth round edges	Well covered. Have to push firmly to get fingers underneath	Cannot be felt at all	
Muscle	Very little Concave	Concave	Not concave. Not convex	Maximally developed. Convex	
Fat layer	No	Very thin	Moderate	Thick	Very thick to form a dip along top midline



Condition score: 1 2 3 4 5

**Description:**

- The condition scoring is performed over the lower back area.
- Cases which do not fit these categories properly i.e. fall between whole numbers, can be assigned half scores eg. 1.5, 2.5 etc.
- This scheme may be used in goats, but half a score is added to the score, since goats preferentially store fat intra-abdominally and not over the lower back.

ARC • LNR  
 University of Pretoria

FIGURA 1. Cartão utilizado para avaliação do 5.√<sup>©</sup> (BATH & VAN WYK, 2009)

### 2.3.2. Taninos

Nos últimos dez anos vários trabalhos foram realizados com plantas ricas em taninos condensados, com o objetivo de avaliar sua utilização no controle das nematodioses em pequenos ruminantes. Maciel et al. (2006) em estudo *in vitro* utilizando extrato de folhas e sementes da planta *Melia azedarach* observaram melhor eficácia na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus* com o extrato da semente quando comparado com o extrato obtido das folhas, nas concentrações de 3,12 a 50 mg mL<sup>-1</sup>. Ademola et al. (2004) observaram redução de 88% na contagem de ovos de helmintos por grama de fezes quando administrado a ovinos 500 mg Kg<sup>-1</sup> peso vivo da planta *Khaya senegalensis* árvore pertencente a família Meliaceae.

Estudos realizados *in vivo* por Cenci et al. (2007) demonstraram atividade anti-helmíntica sobre os nematóides *Trichostrongylus columbriformis*, *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum colombianum* utilizando a planta *Acacia mearnsii* na dose de 18 g Kg<sup>-1</sup> de peso vivo em ovinos. Outras plantas tropicais foram estudadas sobre os efeitos anti-helmínticos em pequenos ruminantes como *Acacia cianophylla* (AKARI et al., 2008); *Leucena leucocephala* por Rojas et al. (2006); *Acacia mollissima* por Minho et al. (2007), sendo o principal efeito observado a redução na excreção de ovos de helmintos.

Alonso Diaz et al. (2010) relataram que ainda é necessário a definição de muitos aspectos envolvidos como parte da planta, a idade, a interação entre plantas e seus componentes, estado fisiológico da planta, os animais em questão (espécie, idade, estado fisiológico), aspectos de purificação, extração e dose para que haja regularidade de produção e utilização destes no controle de nematódeos. Segundo Ketzis et al. (2006) ainda não há fortes evidências de que o consumo de taninos condensados melhore o desempenho dos animais a um nível que resulte em benefício econômico.

### 2.3.3. Imunonutrição

Coop & Kyriazakis (1999) propuseram o conceito da priorização da alocação de nutrientes para várias funções do corpo quando há escassez de recursos alimentares, sendo a principal prioridade a manutenção corpórea, na sequência o crescimento, funções reprodutivas e somente então a expressão da imunidade.

A suplementação de proteína na dieta resulta em um aumento na concentração de leucócitos na circulação e na proporção de células derivadas do timo que estão associadas com a expressão da imunidade celular na resposta imune local ao *T. colubriformis* (KAMBARA & MCFARLANE, 1996). Estudos realizados por Kahan et al (2003); Athanasiadou et al. (2008) e Kidane et al. (2009) verificaram que a suplementação protéica na dieta com farelo de soja, farelo de peixe, farelo de girassol e uréia, reduziram a contagem de ovos de helmintos por grama de fezes e a carga parasitária em pequenos ruminantes na fase de crescimento e no pré-parto. E para melhorar a resiliência ou resistência em cordeiros e em ovelhas no peri-parto o nível de proteína na alimentação dever ser aumentado em torno de 25% (HOUDIJK et al., 2003).

Segundo Ketzis et al. (2006) a relação custo-benefício da imunonutrição a curto prazo, é maior do que a utilização de anti-helmínticos, porém a avaliação econômica deve ser realizada considerando todos os benefícios como aumento da resiliência nos animais parasitados, diminuição na contagem de ovos de helmintos por grama de fezes com consequente diminuição na contaminação das pastagens, desmame dos cordeiros com um melhor peso em virtude do aumento na produção de leite, uma vez que esses benefícios em termos de produtividade são freqüentemente manifestados após um longo período de tempo.

#### 2.3.4 Manejo de pastagem

O manejo de pastagem tem sido utilizado sob diferentes formas com o intuito de minimizar a exposição dos animais as larvas infectantes de tricostrongilídeos. Embora seja uma importante ferramenta no controle da verminose em pequenos ruminantes, a sua implementação com êxito depende do conhecimento detalhado da propriedade, dos parasitos e dos hospedeiros (JACKSON et al., 2009).

A contribuição do manejo da pastagem para o controle da verminose consiste na diminuição do número de larvas presentes, obtida através da intensa exposição à radiação solar (dessecação e radiação ultravioleta) que se verifica após o período de pastejo, quando em função do rebaixamento da altura do relvado ocorre a insolação plena até a base da touceira (BUENO et al., 2008). A luz solar direta mata os ovos e as larvas de *Haemonchus* e *Trichostrongylus* relativamente rápido (O' CONNOR et al., 2006). Outra alternativa que vem sendo estudada é a utilização de espécies diferentes de forrageiras que influenciam na dinâmica das larvas infectantes. Estudos têm demonstrado que os animais em diferentes tipos de forragem não mostram os mesmos níveis de infecção por nematódeos gastrintestinais (NIEZEN et al., 1998; 2002).

A adequada oferta de forragem também pode ser utilizada como estratégia de controle da verminose em ovinos, com a redução do contato do animal com larvas infectantes. Pastagens de Pensacola e Aruana com baixa oferta de forragem favorecem o contato do ovino com larvas infectantes de helmintos acarretando maior carga parasitária nos animais. Pastagem de Aruana na oferta de 9% matéria seca por quilo de peso dos animais reduz a carga parasitária, devido a diminuição da contaminação da pastagem (GAZDA et al., 2009).

### 2.3.5 Controle Biológico

O controle biológico tem por definição utilizar populações de organismos vivos, (parasitos, predadores, patógenos, antagonistas ou competidores) já existentes na natureza, para reduzir a população de organismos nocivos, tornando-o menos abundante do que era anteriormente. Estes organismos não atuam diretamente sobre os estágios parasitários no hospedeiro, suas ações são sobre hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais (GRONVOLD et al., 1996).

Segundo Thamsborg et al. (1999) o controle biológico de nematóides parasitos de ruminantes visa a manutenção dos animais sob pastejo com baixa exposição a larvas infectantes de forma que não causem prejuízos a sua saúde, mas que assegurem o desenvolvimento da imunidade natural adquirida. Tal controle nunca será um substituto para a quimioterapia, porém devem ser incorporado juntamente com outras opções em sistemas integrados de manejo para o desenvolvimento de uma pecuária sustentável no século XXI (WALLER & LARSEN, 1993).

Vários organismos apresentam atividades predatórias contra nematódeos gastrintestinais, mas os mais utilizados e conhecidos são os fungos nematófagos.

#### 2.3.5.1 Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos são inimigos naturais dos nematóides, os quais desenvolveram estratégias para infectá-los ou capturá-los, para sua alimentação ou sobrevivência. São classificados como Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae. Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzem-se agamicamente por esporos formados sobre ramificações do micélio (DRESCHLER, 1937 citado por MOTA et al., 2003).

Atualmente são conhecidos apresentando este tipo de atividade os gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella*, *Duddingtonia*, *Lactydina*, *Monacrosporium* e *Trichothecium* (RUBNER, 1996). Mais de 200 espécies de fungos nematófagos estão catalogadas (NORDBRING-HERTZ et al., 2006), porém segundo Larsen (2000) apesar de existir uma grande variedade de espécies os principais estudos tem se concentrado com espécies predadoras pertencentes aos gêneros *Dunddingtonia*, *Arthrobotrys* e *Monacrosporium*.

Os fungos com atividade predatória são classificados em três grupos com base no mecanismo de ação em fungos predadores, endoparasitos e parasitos de ovos. As espécies de fungos pertencentes ao grupo dos predadores formam armadilhas como redes adesivas, anéis constritores ou não, botões, ao longo de suas hifas utilizando-as para capturar e penetrar no corpo do nematóide e consumi-lo rapidamente (BARRON et al., 1977). Fazem parte deste grupo o gênero *Arthrobotrys* como as espécies *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, as quais produzem redes adesivas tridimensionais; a espécie *Arthrobotrys dactyloides* formam anéis constritores e capturam a presa mecanicamente. E, como exemplo de botões e colunas adesivas pode ser citado o gênero *Monacrosporium*. (NORDBRING-HERTZ et al., 2006).

Os fungos endoparasitos infectam os nematóides através de seus esporos. A infecção pode ocorrer através da aderência do esporo à cutícula do nematóide ou através da sua ingestão. Os esporos germinam rapidamente e se difunde pela cavidade corpórea, absorvendo todo conteúdo do nematóide (GRAY, 1987). São pertencentes a este grupo *Drechmeria coniospora*, *Hirsutella rhossoliensis*, *Haptoglossa dickii* and *Catenaria anguillulae* (NORDBRING-HERTZ et al., 2006).

Os fungos parasitos de ovos fixam suas hifas danificando a casca do ovo provavelmente por ação de enzimas, facilitando a penetração para em seguida provocar sua destruição. Como exemplo pode ser citado *Pochonia clamidosporium* (PADILHA, 1996).

Um quarto grupo foi proposto por Li et al. (2000) que são os fungos produtores de toxinas, como *Pleurotus ostreatus*, que imobiliza o nematóide pela toxina produzida por suas hifas especializadas as quais crescem quimiotropicamente em direção a boca de suas presas, digerindo-as (NORDBRING-HERTZ et al., 2006). Luo et al. (2006) relataram que o fungo *Stropharia rugosoannulata* poderiam representar um quinto grupo, pois agem mecanicamente danificando a cutícula do nematóide com uma estrutura redonda e espinhosa denominada “Spiny Ball”.

O mecanismo de interação fungo-nematóide é bastante complexo envolvendo processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos. A primeira etapa neste processo é a adesão dos nematóides as armadilhas no qual pode estar envolvido a ligação entre um carboidrato (receptor) presente na cutícula do nematóide e uma proteína (lecitina) presente no fungo. Esses nematóides são atraídos por substâncias liberadas pelos micélios e armadilhas dos fungos predadores, ou dos esporos pelos fungos endoparasitos. A segunda etapa consiste na penetração do fungo no nematóide, provavelmente envolve enzimas hidrolíticas que solubilizam as macromoléculas da cutícula que associada a pressão mecânica exercida pelo fungo consegue penetrar, infectar e digerir o nematóide (NORDBRING-HERTZ et al., 2006).

#### 2.3.5.2 Principais fungos utilizados na saúde animal e método de aplicação

Estudos envolvendo fungos nematófagos na saúde animal tiveram seu início no século XX, na França, os quais mostraram a ação dos fungos predadores sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* e *Bunostomum phlebotomum* em condições laboratoriais e a campo



(DESCAZEUX 1939, DESCAZEUX & CAPELLE 1939, ROUBAUD & DESCAZEUX, 1941 citado por MOTA et al., 2003).

Na década de 90, vários estudos com fungos nematófagos foram realizados impulsionados pela busca de alternativas no controle da verminose tendo em vista o crescente aumento da resistência anti-helmíntica principalmente em pequenos ruminantes, relatados por diversos pesquisadores do Brasil (THOMAZ-SOCCOL et al., 1996; 2004; MOLENTO, 2004a; ROSALINKI-MORAES et al., 2007; FALBO et al., 2009) e de outras regiões do mundo (SANGSTER, 1999; VAN WYK et al., 1999; CHARTIER et al., 2001).

Desde então, testes *in vitro* foram realizados em placas de Petri com diferentes espécies de fungos nematófagos sobre larvas infectantes de tricostrongilídeos. Mendoza-de-Gives et al. (1992), mostraram atividade predatória do fungo *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* com predação de 92,33% após sete dias de incubação. Posteriormente, verificaram que quando adicionados 20.000 conídios dos fungos *Arthrobotrys eudermatum*, *Arthrobotrys oligospora* e *Arthrobotrys robusta*, por grama de fezes reduziram em 95,7%, 98,3% e 10,1% respectivamente, o número de larvas infectantes de tricostrongilídeos recuperados na coprocultura (MENDOZA-DE-GIVES et al., 1994).

No Brasil, Araújo et al. (1992; 1994) realizaram experimentos *in vitro* em placas de Petri e demonstraram atividade dos fungos *Arthrobotrys* spp e *Monacrosporium ellipsosporum* contra larvas de *Haemonchus placei*. Graminha et al. (2001) demonstraram eficácia de 94,44% para o fungo *Arthrobotrys musiformis* e 89,39% para *Arthrobotrys conoides* contra larvas de *Haemonchus contortus*, em teste *in vitro* realizado em placas de Petri.

Eslami et al. (2005) no Irã, utilizando uma cepa nativa do *Arthrobotrys cladodes* isolado naquela região, verificaram que há uma correlação direta com o número de conídios do fungo adicionados por grama de fezes com o índice de redução, ou seja, com adição de

100.000 conídios obtiveram redução de 94,96% de larvas infectantes (L3) de *H. contortus* e 41,71% de redução quando foi adicionado 1.000 conídios.

Concomitantemente aos testes laboratoriais várias pesquisas em diversas partes do mundo foram realizadas a campo. Larsen et al. (1992), verificaram redução no número de larvas infectantes recuperadas na coprocultura quando administrado o *Arthrobotrys superba* em grãos de cevada a bovinos infectados com parasitos gastrintestinais. Estudos de campo realizado com bezerros por Wolstrup et al. (1994) e Larsen (1995) demonstraram redução significativa de L3 na pastagem após um período de dois a três meses de administração.

No Brasil, Araújo et al. (1998) em um trabalho realizado a campo com bovinos, verificaram diminuição na contagem de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) e na quantidade de helmintos nos animais traçadores, quando administraram oralmente conídios de *A. robusta*, duas vezes por semana durante quatro meses.

Fontenot et al. (2003), nos Estados Unidos, trabalharam com ovelhas e administraram por via oral a dose de  $5 \times 10^5$  clamidosporos por Kg de peso vivo (P.V) misturados na ração por um período de 18 semanas. Os autores verificaram por meio de coproculturas redução de 99,3% de L3 de tricostrongilídeos na décima terceira semana, obtendo média de redução durante o período experimental de 78,9%. Observaram também redução de larvas infectantes na pastagem, no entanto, não verificaram diferenças significativas no OPG, hematócrito e ganho de peso dos animais.

Gomez-Rincon et al. (2006), na Espanha, administraram por via oral  $5 \times 10^5$  clamidosporos de *D. flagrans* a ovinos e verificaram uma clara redução no número de L3 na pastagem. A constatação da redução foi mais evidente na oitava semana de pastejo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na contagem de OPG, concentração de pepsinogênio e ganho de peso dos animais.

Maingi et al. (2006), no Sul da África, utilizando tratamento seletivo (Famacha<sup>®</sup>) e administração oral diária de clamidósporos de *D. flagrans* na dose  $5 \times 10^5$  por quilo de P.V em caprinos, por um período de quatro a seis meses, constataram redução no número de tratamentos anti-helmínticos, mas não encontraram diferença significativa no número de larvas infectantes na pastagem, e atribuem como possíveis causas a altura da pastagem, método de extração de L3 e ao tratamento anti-helmíntico realizado nos animais durante o experimento.

Em um estudo realizado na Holanda por Eysker et al. (2006) e, outro na Suíça por Faessler et al. (2007) administraram por via oral em cordeiros a dose diária de  $5 \times 10^5$  e  $10^6$  clamidósporos de *D. flagrans* por quilo de peso vivo, respectivamente, por um período de quatro meses, não encontraram nenhum efeito significativo nos parâmetros parasitológicos como contagem de OPG, contagem de L3 na pastagem e ganho de peso, embora a atividade do fungo tenha sido claramente visível nas coproculturas. Resultados semelhantes foram relatados por Epe et al. (2009) em experimento com ovinos e caprinos na Alemanha, os quais atribuíram esses resultados aos fatores climáticos durante o experimento como o alagamento da pastagem o que poderia ter influenciado de forma negativa na estrutura das fezes separando os esporos das larvas.

Faedo et al. (2000) estudaram a adição de fezes de ovinos com clamidósporos de *D. flagrans* sobre parcelas de pastagens em diferentes tempos e verificaram que nas parcelas onde foram colocadas simultaneamente fezes com ovos de nematóides e com clamidósporos houve redução significativa na contagem de larvas de tricostrongilídeos (L3) na pastagem em relação ao controle. Porém, quando colocaram fezes com ovos de nematóides e duas semanas após adicionaram fezes com clamidósporos, verificaram que não houve diferença significativa quando comparado com o controle, e sugeriram três possibilidades: *D. flagrans* não se desenvolve fora do ambiente fecal, ou seja, no solo circundante ou na pastagem; a segunda

hipótese é que o fungo poderia ter se desenvolvido na pastagem ou no solo, porém, não rápido o suficiente para impedir a migração de L3 na pastagem, e como terceira hipótese, o fungo poderia ter se desenvolvido como saprófita.

Faedo et al. (2002) sugeriram que o fungo *D. flagrans* tinha um crescimento mínimo no solo ao redor das fezes de ovinos e bovinos alimentados com clamidósporos, constatado pelo monitoramento do número de nematóides nesse local, mas relataram que há uma variabilidade entre o número mínimo e o máximo de nematóides encontrados por outros pesquisadores. Relataram que o ideal seria monitorar o crescimento do fungo e sua atividade no solo, porém ainda não há um método desenvolvido que possibilite tal avaliação.

E a partir desta hipótese, todos os trabalhos até o momento, foram realizados com clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* administrados por via oral, por sua capacidade de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de ruminantes bem como o subsequente desenvolvimento deste fungo nas fezes, formando redes tridimensionais, aprisionando as larvas infectantes, antes de migrar para pastagem (LARSEN et al., 1992; GRONVOLD et al., 1993; WALLER et al., 1994). Porém, a forma de administração oral, muitas vezes torna difícil de mensurar a quantidade de esporos ingerida, dificultando a distribuição de forma homogênea na pastagem (EPE et al., 2009) que é crucial para o desenvolvimento do fungo (WALLER et al., 2001; PENA et al., 2002).

Outro ponto estudado é a diferença de resultados entre a espécie bovina e ovina quando da utilização de fungos nematófagos. Faessler et al. (2007) relataram que os estudos desenvolvidos com bovinos apresentam melhores resultados quando comparados com os trabalhos realizados com pequenos ruminantes, e, uma possível explicação para isso seria a estrutura das fezes de bovinos, existindo melhores condições de umidade para o desenvolvimento do fungo quando comparado com as fezes de ovinos e caprinos.

Estudos têm relatado a importância de novos métodos de administração de fungos nematófagos aos animais (FAESSLER et al., 2007; EPE et al., 2009) que possam ao mesmo tempo serem práticos e eficientes, como por exemplo adicionados ao sal mineral (FONTENOT et al., 2003), porém Garcia et al. (2007) verificaram redução na sobrevivência e atividade predatória do fungo *A. musiformis* liofilizado adicionados ao sal comum e ao sal mineral.

Desta maneira, os principais gargalos para o desenvolvimento de formulações comerciais são a produção em larga escala, armazenamento e a forma de administração aos animais (MOTA et al., 2003). Seria, portanto, interessante que outras formas de administração dos esporos aos animais sejam avaliadas.

### 3. REFERÊNCIAS

- ADEMOLA, I.O., FAGBEMI, B.O., IDOWU, S.O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* e *in vivo* studies. **Vet. Parasitol.** 22, 151–164, 2004.
- AKARI, H., DARGHOUTH, M.A., BEN SALEM, H. Preliminary investigations of the anti-nematode activity of *Acacia cyanophylla* Lindl. excretion of gastrointestinal nematode eggs in lambs browsing *A. cyanophylla* with and without PEG or grazing native grass. **Small Rumin. Res.** 74, 78–83, 2008.
- ALLONSO-DIAZ, M.A.; TORRES-ACCOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H. Tanins and tropical tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe **Small Rumin. Res.** 2010 doi:10.1016/j.smallrumres.2009.12.040.
- AHRENS, D.C. Rede de Propriedades Familiares Agroecológicas (Agroecological Family Properties Network). In: Tech Bull, 68, IAPAR, Instituto Agrônômico do Paraná, 79 pp., 2006.
- AMARANTE, A. F. T.; PADOVANI, C. R.; BARBOSA, M. A. Contaminação da pastagem por larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de bovinos e ovinos em Botucatu-SP. **Ver. Bras. de Parasitol. Vet.** 5, 2, 65-73, 1996.
- AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A. Comparison between pasture sampling and tracer lambs to evaluate contamination of sheep pastures by nematode infective larvae. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 7, 2, 95-99, 1998.
- AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose gastrointestinal no sistema de produção de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA, 1, Paraná. **Anais...** 2004.

AMARANTE, A. F. T. **Controle das Helmintoses Gastrintestinais de Ovinos e Caprinos.**

2010. Disponível em: [www.ascoco.com.br/ascoco/arquivos/not](http://www.ascoco.com.br/ascoco/arquivos/not). Acesso em 05/06/2010.

ARAÚJO J.V.; SANTOS M.A.; FERRAZ S.; MAIA A.S.; MAGALHÃES A.C.M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 44, 521-526, 1992.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control “in vitro” of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 46, 197-204, 1994.

ARAÚJO J.V.; GOMES A.P.S.; GUIMARÃES M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 7, 117-122, 1998.

ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.; KIRYAZAKIS, I. Exploiting synergism and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. **Small Rumin. Res.** 76, 2-11, 2008.

BAKER, R. L. Characterization and utilization of sheep and goat breeds that are resistant to helminths. In: LE JAMBRE, L. F.; KNOX, M. R. **Sustainable parasite control in small ruminants.** Bogor: ACIAR, p. 172-177. (Proceedings, n. 74) 1996.

BARRON, G.L. The nematode-destroying fungi. **Top. Mycobiol.**, 1. Canadian Biological Publications, Guelph, pp 1–140, 1977.

BATH, G. F., VAN WYK, J. A. The five points check for target selective treatment of internal parasites in small ruminants. **Small Rumin. Res.** 86, 6-13, 2009.

BAYLE, J. N.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L. P. Comparison of strategies to provide lambing paddocks of low gastro – intestinal nematode infectivity in a summer rainfall region of Australia. **Vet. Parasitol.** 161, 218-231, 2009.

BIANCHIN, I.; MELO, H. J. **Epidemiologia e controle de helmintos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados.** Circular Técnica EMBRAPA – CNPGC, 16, 1985. 60p.

BOWMAN, D. D.; GEORGI, J. R.; LYNN, R. C. **Georgi's Parasitology for Veterinarians.** 8 ed. Saunders Publishing Company, St. Louis, Missouri, 2003. 422p.

BUENO, M. S.; VERÍSSIMO, C. J.; CUNHA, E.A.; SANTOS, L.E. O controle da verminose em sistemas intensivo de produção de ovinos para o abate, 2008. Disponível em: [www.iz.gov.br](http://www.iz.gov.br). Acesso em 11 de Junho de 2010.

CENCI, F.B., LOUVANDINI, H., MCMANUS, C.M., DELL'PORTO, A., COSTA, D.M., ARAÚJO, S.C., MINHO, A.P., ABDALLA, A.L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminths. **Vet. Parasitol.** 144, 132–137, 2007.

CHARTIER, C., SOUBIRAC, F., PORS, I., SILVESTRE, A., HUBERT, J., COUQUET, C., CABARET, J. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. **J. Helminthol.** 75, 325–330, 2001.

COOP, R.L., KYRIAZAKIS, I. Nutrition-parasite interaction. **Vet. Parasitol.** 84, 187–204, 1999.



COUTO, F. A. A. Dimensionamento do mercado de carne ovina e caprina no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE OVINOS E CAPRINOS, 3. 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 71-81, 2003.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance of sheep in Southern Latin America. **Braz. Vet. Parasitol.** 62, 199-206, 1996.

EPE, C.; HOLST, C.; KOOPMANN, R.; SCHNIEDER, T.; LARSEN, M.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. **Vet. Parasitol.** 159, 86–90, 2009.

ESLAMI, A.; RANJBAR-BAHADORI, S.; ZARE, R.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Vet. Parasitol.** 130, 263–266, 2005.

EYSKER, M.; BAKKER, N.; VAN DER HALL, Y.A.; VAN HECKE, I.; KOOYMAN, F.N.; VAN DER LINDEN, D.; SCHRAMA, C.; PLOEGER, H.W. The impact of daily *Duddingtonia flagrans* application to lactating ewes on gastrointestinal nematodes infections in their lambs in the Netherlands. **Vet. Parasitol.** 141, 91–100, 2006.

FAEDO M.; LARSEN, M.,S.; THAMSBORG, S. Effect different times of administration of the nematophagous fungus *Dunddingtonia flagrans* on the transmission of ovine parasitic nematodes on pasture – a plot study. **Vet. Parasitol.** 94, 55-65, 2000.

FAEDO M.; LARSEN, M.; S. DIMANDER, O. G.; YEATES, W.; HOˆGLUND, J.; WALLER, P. J. Growth of the Fungus *Duddingtonia flagrans* in Soil Surrounding Feces Deposited by Cattle or Sheep Fed the Fungus to Control Nematode Parasites. **Biol. Control** 23, 64–70, 2002.

FAESSLER H.; TORGERSON, P. R.; HERTZBERG, H. Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. **Vet. Parasitol.** 147, 96–102, 2007.

FALBO, M.K.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SANDINI, I.E.; NEUMANN, M.; ISHIY, T. M.. Atividade anti-helmíntica do Triclorfon e Closantel em cordeiros naturalmente infectados por *Haemonchus* sp. **Rev. Ciênc. An. Bras.** 10, 926-930, 2009.

FAO, 2009. El estado mundial de la Agricultura & Alimentación. Disponível em [www.org.fao](http://www.org.fao). Acesso em 10 de Abril de 2010.

FONTENOT, M.E. ; MILLER, J.E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Vet. Parasitol.** 118, 203–213, 2003.

GARCIA, A. M. Sobrevivência e manutenção da atividade predatória do fungo *Arthrobotrys musiformis* submetido à liofilização. **Cienc. Agrotec.**, 31, 1203-1206, 2007.

GAZDA, T.; PIAZZETTA, R.; DITTRICH, J.; MONTEIRO, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Distribution of nematode larvae of sheep in tropical pasture plants. **Small Rum. Res.** 82, 94-98, 2009.

GOMEZ-RINCON, C.; URIARTE, J.; VALDERRABANO, J. Efficiency of *Duddingtonia flagrans* against Trichostrongyle infections of sheep on mountain pastures. **Vet. Parasitol.** 141, 84–90, 2006.

GRAMINHA, E.B.N.; MAIA, A.S.; SANTOS, J.M.; CANDIDO, R.C.; SILVA, G.S.; COSTA, A.J. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. **Sem. Cienc. Agr.** 22, 11–16, 2001.

GRAY N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biol. Rev.** 62, 245–304, 1987.

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S.V.A.; NANSEN, P. Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. **J. Helminthol.** 67, 31-36, 1993.

GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; FRIBERT, L. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rates in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **J. Helminthol.** 70, 291-297, 1996.

HOSTE, H., TORRES-ACOSTA, J.F.J., AGUILAR CABALLERO, A.J. Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? **Parasite Immunol.** 30, 79–88, 2007.

HOUDIJK, J.G., KYRIAZAKIS, I., JACKSON, F., HUNTLEY, J.F., COOP, R.L. Is the allocation of metabolisable protein prioritised to milk production rather than to immune functions in *Teladorsagia circumcincta*-infected lactating ewes? **Int. J. Parasitol.** 33, 327–338, 2003.

IBGE. Efetivo rebanho por tipos de rebanho. Disponível em [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br) . Acesso em 10 de abril de 2010.

JACKSON, F.; BARTLEY, D.; BARTLEY, Y. ; KENYON, F. Worm control in sheep in the future. **Small Rumin. Res.** 86, 40-45, 2009.

KAHN, L.P., KNOX, M.R., GRAY, G.D., LEA, J.M., WALKDEN-BROWN, S.W. Enhancing immunity to nematode parasites in singlebearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. **Vet. Parasitol.** 112, 211–225, 2003.

KAMBARA, T., MCFARLANE, R.G. Changes in T cell subpopulations of sheep due to age and dietary protein intake: association with protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis*. **Vet.Immunol. Immunopathol.** 51, 127–135, 1996.

KENYON, F.; GREER, A.W.; COLES, G.C.; GRINGOLI, G.C.; PAPADOPOULOS, E.; CABARET, J.; BERRAG, B.; VARADY, M.; VAN WYK, J. A.; THOMAS, E.; VERCRUYSE, J.; JACKSON, F. The role of target selective treatments in the development of refugia based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Vet. Parasitol.** 164, 3-11, 2009.

KETZIS, J. K.; VERCRUYSE, J.; STROMBERG, B.E.; LARSEN, M.; ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.G.M. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. **Vet. Parasitol.** 139, 321–335, 2006.

KIDANE, A.; HOUDIJK, J. G. M.; TOLKAMP, B.J. ; ATHANASIADOU, S.; KIRYAZAKIS, I. Consequences of infection pressure and protein nutrition on periparturient to resistance *Teladorsagia circumcincta* and performance in ewes. **Vet. Parasitol.** 165, 78-87, 2009.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **J. Helminthol.** 66, 2, 37-141, 1992.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; ZORN, A. Biological-control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Vet. Parasitol.** 60, 321–330, 1995.

LARSEN, M. Biological Control of Helminths. **Int. J. Parasitol.** 29, 139-146, 1999.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. **Parasitol.** 120, 121-131, 2000.

LI, T.F.; ZHANG, K. Q.; LIU, X. Z. Taxonomy of nematophagous fungi. **Chin. Sci. Tech. Publish.** s/n, 2000.

LUO, H.; LI, X.; LI, G.H.; PAN, Y. B.; ZHANG, K.Q. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode-attacking device. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72, 2982–2987, 2006.

MACIEL, M.V.; MORAES, S.M.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELHOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C.; CASTRO, C.M.S. Ovicidal and larvicidal of Melia azedarach extracts on *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.** 140, 98-104, 2006.

MAINGI, N.; KRECEK, R.C.; BILJON, N. VAN. Control of gastrointestinal nematodes in goats on pastures in South Africa using nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and selective anthelmintic treatments. **Vet. Parasitol.**, 138, 328-336, 2006.

MCCLURE, S. J. Sheep immunity to gastrointestinal nematode parasites- review 2000. **CSIRO Livestock Industries**, F.D. McMaster Laboratory. Armidale, Australia. <http://www.csiro.au/scips>, 2000.

MCLEOD, R.S. Costs of major parasites to the Australian livestock industries. **Int. J. for Parasitol.** 25, 1363–1367, 1995.

MEAT & LIVESTOCK AUSTRALIA–MLA. Australia's sheepmeat industry 2009. [www.mla.com.au](http://www.mla.com.au) .Acesso em 11 de Abril 2010.

MENDOZA DE GIVES, P.; ZAVALA-MEJIA, E.; QUIROZ-ROMERO, H.; HERRERA-RODRIGUES, D.; PERDOLMO-ROLDAN, F. Interaction between the nematode destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (Hyphomycetales) and *Haemonchus contortus* infective larvae *in vitro*. **Vet. Parasitol.** 41, 101-107, 1992.

MENDONZA DE GIVES P.; ZAVALA-MEJIA, E.; HERRERA-RODRIGUES, D.; QUIROZ-ROMERO, H. *In vitro* trapping capability of *Arthrobotrys* spp on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. **J. Helmintol.** 68, 223 – 229, 1994.

MINHO, A.P., BUENO, I.C.S., LOUVANDINI, H., JACKSON, F., GENNARI, S.M., ABDALLA, A.L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Anim. Feed Sci. Technol.** 147, 172–181, 2007.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Simpósio Latino Americano de ricketisioses, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais....** Ouro Preto, MG, 2004a

MOLENTO, M.B., VAN WYK, J.A., COLES, G.C. Sustainable worm management. **Vet. Rec.** 155, 95–96, 2004b.

MORAES, F. R.; SARNOSKI JUNIOR, S.; SAULT, J. P. E.; OLIVEIRA, V. P.; CASTRO, E.A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 6, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Ed. UFPR, 1998. p. 427.

MORAES, F. R. **Uso de marcadores imunológicos na avaliação da resposta imune dos ovinos à infecção natural por nematódeos e na seleção de animais resistentes às parasitoses.** Curitiba, 2002. 194f. Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesq. Vet. Bras.**, 23, 93-100, 2003.

NIEUWHOF, G.J., BISHOP, S.C. Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. **Anim. Sci.** 81, 23–29, 2005.

NIEZEN, J. H.; ROBERTSON, H. A.; WAGHORN, G. C.; CHARLESTON, W. A. G.

Production, faecal egg counts and worm burdens of ewes lambs which grazed six contrasting forages. **Vet. Parasitol.** 80, 15-27, 1998.

NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; SIDEY, A.; WILSON, S. R. The effect of pasture on the parasitism and performance of lambs grazing on of three grass – White clover pasture swards. **Vet. Parasitol.** 105, 303-315, 2002.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. In: **Encyclopedia of Life Sciences**, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester. ,doi:10.1038/npg.els.0004293, <http://www.els.net/>. p.1-11, 2006.

O'CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KAHN, L. P. Ecology of free living of major trichostrongylid parasite of the sheep. **Vet. Parasitol.** 142, 1-15, 2006 .

OLIVEIRA; V. P.; MORAES, F. R.; ZAGO, M; POLLATI, L.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de

Guarapuava - Paraná. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 7, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Ed. UFPR, 1999. v.2. p. 494.

O'SULLIVAN, B.M., DONALD, A.D. A field study of nematode parasite populations in the lactating ewe. **Parasitol.** 61, 301–315, 1970.

PANDEY, V.S. Predatory activity of nematode-trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagia* possible method of biological control. **J. Helminthol.** 48, 35–48, 1973.

PADILHA, T.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos trichostrongilídeos: Uma alternativa para higienização das pastagens. In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p.215-237, 1996.

PENA, M.T.; MILLER, J.E.; FONTENOT, M.E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. **Vet. Parasitol.** 103, 259–265, 2002.

PERRY, B.D.; RANDOLPH, T.F.; MCDERMOTT, J. J.; SONES, K. R.; THORNTON, P.K. **Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty**. ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Kenya, p.148, 2002.

POMROY, W.E. Anthelmintic resistance in New Zealand: a perspective on recent 766 findings and options for the future. **N. Z. Vet. J.** 54, 265-270, 2006.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária – um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Guanabara Koogan, 2002. 1770p.



ROJAS, D.K., LÓPEZ, J., TEJADA, I., VÁSQUEZ, V., SHIMADA, A., SÁNCHEZ, D., IBARRA, F. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. **Anim. Feed Sci. Technol.** 128, 218–228, 2006.

ROSALINSKI-MORAES, F.; MORETTO, L.M.; BRESOLIN, W.S.; GABRIELLI, I.; KAFER, L.; ZANCHET, I.K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do Alto Irani (Amai), oeste de Santa Catarina. **Ciênc. Anim. Bras.** 8, 559-565, 2007.

RUBNER, A. Revision of predacious hyphomycetes in the Dactylella-Monacrosporium complex. **Stud. Mycol.** 39, 1996.

SANGSTER, N.C. Anthelmintic resistance: past, present and future. **Int. J. Parasitol.** 29, 115–124, 1999.

SANTIAGO, M. A. M.; BEVENGA, S. F.; COSTA, U. C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no Município de Itaqui, Rio Grande do Sul. **Pesq. Agrop. Bras.**, Série Veterinária 11,1-7, 1976.

SOULSBY, L. New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: the role of refugia. **Vet. J.** 174, 6-7, 2007.

SRETER, T., MOLNAR, V., KASSAI, T. The distribution of nematode egg counts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. **Int. J. Parasitol.** 24, 103-108, 1994.

SUAREZ, V.H.; CRISTEL, S.L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in western Pampeana region of Argentina. **Vet. Parasitol.** 144, 111-117, 2007.

THAMSBORG, S.M.; POEPSTORFF, A.; LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. **Vet. Parasitol.** 84, 169-186, 1999.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Vet. Rec.** 139, 421-422, 1996.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Braz. Arch. Biol. Technol.** 47, 41-47, 2004.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Rum. Res.**, 77, 159-173, 2008.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. 276p.

VAN WYK, J.A.; STENSON, M.O.; VAN DER MERWE, J. S.; VORSTER, R.J.; VILJOEN, P.G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **J. Vet. Res.** 66, 273–284, 1999.

VAN WYK, J.A. Refugia—overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 68, 55–67, 2001.

VAN WYK, J.A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R.M.; BESIER, R.B. Target selective treatment for worm management – How do you sell rational programs to farmers **Vet. Parasitol.** 139, 336-346, 2006.

VLASSOFF, A.; LEATHWICK, D. M.; HEATH, A. C. G. The epidemiology of nematode infections of sheep. **New Zeal. Vet. J.** 49, 6, 213-221, 2001.

WALLER, P. J.; LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. **Internat. J. Parasitol.** 23, 539-546, 1993.

WALLER, P. J. The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. **Acta Trop.** 56, 233-243, 1994.

WALLER, P.J., 1997. Anthelmintic resistance. **Vet. Parasitol.** 72, 391-412, 1997.

WALLER, P.J.; FAEDO, M.; ELLIS, K. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. **Vet. Parasitol.** 102, 299–308, 2001.

WALLER, P. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Anim. Feed Sci. Technol.** 126, 277–289, 2006.

WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; BOGH, H.O.; ILSOE, B. An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. **J. Helminthol.** 68, 175–180, 1994.

## CAPÍTULO 2

### 3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS PARA UTILIZAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

#### RESUMO

O desenvolvimento da resistência dos parasitos aos anti-helmínticos tem ocasionado grandes perdas na produção de pequenos ruminantes, tornando-se necessária a busca por outras alternativas de controle da verminose. O objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar cepas de fungos com atividade predatória contra nematódeos, possíveis de serem utilizados em programas de controle biológico. Para atingir o objetivo proposto foram coletadas cinquenta e seis amostras de solo de diferentes regiões do Estado do Paraná. Duas cepas com atividade predatória foram obtidas, representando 3,5% das amostras analisadas, uma delas foi identificada como *Arthrobotrys musiformis* pela análise morfológica em microscopia óptica e a outra cepa identificada pela análise da sequência DNA pelo algoritmo BLAST com 97% de identidade ao *Arthrobotrys conoides*

**Palavras-chave:** Controle biológico, fungos nematófagos, *Arthrobotrys*, *Haemonchus* sp

## NEMATOPHAGOUS FUNGUS ISOLATED IN PARANA STATE SOIL FOR BIOLOGIC CONTROL OF NEMATODE PARASITES IN SMALL RUMINANTS

### ABSTRACT

The development of anthelmintics resistance has caused economic losses in the production of small ruminants which has led to necessary to search other alternatives to worms' control. The aim of this study was to isolate and identifier strains of fungi with predatory ability. Were collected 56 samples of soil from various regions of the State of Parana-Brazil. Two strains showed this activity, representing 3.5% of the samples collected. The first one was identified as *Arthrobotrys musiformis* by morphological analysis in optical microscopy. The other one we needed made molecular identification because the morphological identification was inconclusive. The DNA sequencing showed 97% of identity with *Arthrobotrys conoides*.

**Keywords:** biological control, nematophagous fungi, *Haemonchus sp.*

### 3.1. INTRODUÇÃO

Estudos realizados em três principais países produtores de ovinos (Austrália, África do Sul e Uruguai) classificaram as nematodioses como a doença mais importante para esta espécie animal (WALLER, 2006). No Brasil, o cenário não é diferente. Entre os entraves para controle destas doenças ressalta-se a elevada resistência dos helmintos gastrintestinais aos diferentes princípios ativos, que vem sendo relatada desde os anos 90 (WALLER E FAEDO, 1996; ECHEVARRIA et al., 1996; THOMAZ-SOCCOL et al., 1996, 2004).

Para resolver este problema novos métodos de controle das helmintoses gastrintestinais de ruminantes estão sendo estudados. Dentre eles destaca-se o controle biológico utilizando fungos nematófagos (WALLER, 2006; KETZIS et al., 2006). A identificação de agentes biológicos com ação predadora sobre as fases de vida livre dos nematóides pode permitir o seu uso integrado a outras medidas de controle, diminuindo a contaminação das pastagens e, conseqüentemente, a infecção nos animais. É uma forma, portanto de reduzir a dependência ao uso de anti-helmínticos (WALLER & FAEDO, 1993).

Os fungos nematófagos são encontrados em todas as regiões do mundo, desde os Trópicos à Antártica, em áreas agricultáveis, solo de jardins e florestas, sendo abundantes em solos ricos de matéria orgânica (NORDBRING-HERTZ et al., 2002). Mais de 50 espécies de fungos são capazes de capturar e preda nematóides do solo (WALLER & FAEDO, 1996; ESLAMI et al., 2005). Porém, poucos estudos sobre a atividade predatória de isolados nativos têm sido realizados (MANUELLI et al., 1999; SANYAL, 2000).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar fungos nematófagos do solo oriundos de várias regiões do Estado do Paraná e que apresente potencial atividade predadora para ser utilizado no controle biológico das nematodioses em pequenos ruminantes.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Amostras de Solo

As 56 amostras de solo foram coletadas entre Agosto a Novembro de 2006, provenientes de diferentes regiões do Estado do Paraná como Centro Ocidental, Norte Central, Centro Sul, Sudeste, Oeste e Sudoeste (Figura 1) nas quais abrangiam áreas de atividade agrícola, pecuária, áreas de integração lavoura e pecuária e áreas de preservação (Tabela 1). As amostras foram coletadas na profundidade de 0 a 5 cm, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas, levadas ao laboratório e mantidas sob refrigeração a 4 °C até o processo de isolamento.



Fonte: [www.o-parana.com](http://www.o-parana.com)

FIGURA 1: Mapa do Estado do Paraná mostrando o número de amostras de solo coletadas por mesorregiões.

TABELA 1: Mesorregiões, com os municípios, do Estado do Paraná e os sistemas de produção adotados em cada local de coleta de solo para isolamento de fungos com atividade predatória contra nematódeos.

Mesorregião	Município	Sistema de Produção	Número de amostras
Oeste	Cerro Azul	Integração Lavoura-Pecuária	2
Oeste	Medianeira	Pecuária - Bovinos	2
Noroeste	Goioerê	Pecuária - Bovinos	2
Centro Sul	Pinhão	Pecuária - Bovinos	3
Centro Sul	Pinhão	Pecuária - Ovinos	3
Centro Sul	Pinhão	Integração Lavoura-Pecuária	3
Centro Sul	Pinhão	Área de preservação	3
Centro Sul	Candói	Pecuária - Ovinos	6
Centro Sul	Candói	Pecuária - Bovinos	3
Centro Sul	Guarapuava	Integração Lavoura-Pecuária	6
Centro Sul	Laranjeira do Sul	Pecuária - Bovinos	4
Norte Central	Jardim Alegre	Pecuária - Bovinos	4
Sudoeste	São João	Agricultura	3
Sudoeste	Chopinzinho	Agricultura	2
Sudoeste	Chopinzinho	Pecuária - Bovinos	2
Sudoeste	Flor-da-Serra	Pecuária - Bovinos	2
Centro Oriental	Carambeí	Campo Nativo	2
Centro Oriental	Carambeí	Pecuária - Bovinos	2
Centro Oriental	Carambeí	Integração Lavoura-Pecuária	2
TOTAL			56

### 3.2.2 Larvas de nematódeos de vida livre utilizadas no isolamento

Foram utilizados nematóides de vida livre *Panagrellus* sp., mantidos em placas de Petri contendo meio de aveia em flocos amassada e umedecidas com água destilada (HEINTZ, 1978). Esses nematóides foram extraídos do meio de cultura por imersão de pequenas quantidades de aveia em funil de Baermann e colhidos em tubo de hemólise após seis a oito horas de decantação. Em seguida as larvas foram lavadas (sete vezes), com água destilada, e recuperadas após centrifugação a 72,67 g, por 10 minutos. A cada centrifugação era desprezado o sobrenadante. Posteriormente, as larvas foram mantidas em imersão em uma



solução contendo 0,05 % de estreptomicina e cloranfenicol, durante seis horas. Após esta fase, foi repetido o processo de lavagem descrito anteriormente (ARAÚJO et al., 1994).

### 3.2.3 Isolamento e Identificação de Fungos Nematófagos

O isolamento dos fungos foi realizado conforme método descrito por Duddington (1955) modificado por Santos (1991). Amostras de dois gramas de solo foram distribuídas no centro de placas de Petri contendo meio Água-Ágar 2% (AA) com 0,05% cloranfenicol (Figura 2). Para cada amostra foram feitas duas repetições. Foram adicionados 1 mL de uma suspensão de nematóides de vida livre com aproximadamente 1000 larvas. As placas foram incubadas a 26 °C em estufa B.O.D. (Splabor®), monitoradas diariamente em microscópio estereoscópio (Tecnival®) por um período de dez dias e após semanalmente, durante 30 dias. A cada três dias ou quando necessário foram adicionados mais *Panagrellus* sp. Após a observação de nematóides presos as estruturas fúngicas, discos de cultura foram transferidos para as placas de Petri contendo o meio AA 2% e, novamente, adicionado *Panagrellus* que depois foram repicados em placas contendo meio batata dextrose ágar (BDA) [39 g L<sup>-1</sup> (Himédia®)]. Após a obtenção de culturas puras, foram novamente transferidas para meio AA 2% e adicionadas nematóides de vida livre para confirmar a atividade predatória do fungo isolado.

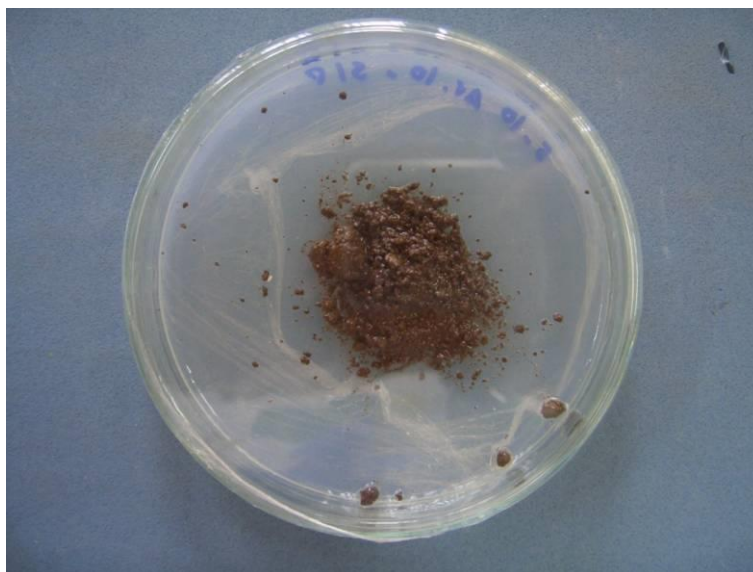


FIGURA 2: Fotografia mostrando a forma de isolamento de fungos com atividade predatória de nematóides em amostras de solo em placas de Petri contendo ágar-água 2%.

#### 3.2.3.1 Identificação morfológica dos isolados

Para a identificação dos isolados foram utilizadas repiques em BDA e, em seguida, foi realizado microcultivo em lâmina para identificação e classificação com base na chave de Cooke & Godfrey (1964) e Philip (2002). Aqueles isolados que não foram conclusivos pela identificação morfológica foi submetido ao sequenciamento da região do espaço interno transcrito (ITS) do gene rDNA.

#### 3.2.3.2. Identificação do fungo isolado pela análise molecular da região do espaço interno transcrito (ITS) do gene rDNA

##### a) Extração do DNA total

Após 4 a 5 dias de cultivo da cepa do fungo cultivada em BDA (Batata Dextrose Agar), discos de cultura de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram transferidos para um tubo eppendorf de 2 mL contendo 300 µL de tampão CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) [CTAB 2% (w/v), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 20 mM, b-mercaptoethanol 0,2% (v/v)] e 80 mg de sílica gel (2:1, w/w) (Merck, Germany). As células foram rompidas

manualmente com pilão estéril por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  do tampão CTAB foi adicionado e a mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a 65 °C. Adicionou-se, em seguida 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e a solução foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 20.500 g. O sobrenadante então foi transferido para um novo tubo e adicionado dois volumes de etanol 96% gelado. O DNA foi precipitado por 30 minutos a -20 °C e centrifugado novamente por 5 minutos a 12.000 g. Posteriormente, o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado. O material foi desidratado em temperatura ambiente, ressuspenso em 97,5  $\mu\text{L}$  TE contendo 2,5  $\mu\text{L}$  RNase 0,02 U  $\mu\text{L}^{-1}$  e incubado por 5 minutos a 37 °C, antes de estocar a -20 °C (GERRITS VAN DEN ENDE & DE HOOG, 1999).

Para controle de qualidade de contaminação intra-amostras de DNA entre as duas cepas foi inserido um controle de extração de DNA denominado de CE.

#### b) Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e Sequenciamento:

As amostras de DNA genômico foram submetidas a PCR para amplificação do DNA. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram LS266 5' GCATTCCCAAACAACCTCGACTC 3' e V9D 5' TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA (WHITE et al., 1990). Um semi nested PCR foi realizado para amplificar a região do espaço interno transcrito (ITS) do gene rDNA utilizando os oligonucleotídicos iniciadores V9G e LS266 (GERRITS VAN DEN ENDE & DE HOOG, 1999). A reação de PCR foi realizada em 20  $\mu\text{L}$  contendo: 2  $\mu\text{L}$  de tampão (1x PCR Buffer), 25 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM de cada dNTP, 10 pmol/ $\mu\text{L}$  dos iniciadores (primers) LS266 e V9D, e 1,25 U de TaqDNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador com o seguinte ciclo de temperaturas, 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, e 3 minutos a 72 °C. Após reação de amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,6% (~6 V/cm 30min) e coradas com 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de brometo de etídeo. Para a

análise do tamanho e concentração dos produtos amplificados utilizou-se o padrão de tamanho molecular de 1 Kb (Invitrogen®).

Como controle de qualidade para detectar possíveis contaminações com amplicons foi realizado um controle negativo em que todos os reagentes foram adicionados com exceção do DNA. Este controle foi denominado de controle negativo (CN).

#### c) Reação de Sequenciamento

O sequenciamento do DNA do isolado foi realizado com os oligonucleotídeos iniciadores ITS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990). O *amplicon* foi purificado com kit de purificação GFX PCR DNA (GE HEALTHCARE, U.K.) e seqüenciado na plataforma ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com o Big Dye® terminator kit. As seqüências foram editadas e alinhadas pelo programa “Staden sequence analysis package v1.6.0” e a análise da seqüência foi realizada pelo algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 56 amostras de solo coletadas em diferentes regiões no Estado do Paraná foram isolados 57 fungos no período de Agosto a Novembro de 2006. Destes, quatro fungos foram visualizados com atividade predatória contra *Panagrellus* sp em meio de cultura AA 2 % (Figura 3).

Na análise pela microscopia óptica, estes fungos apresentaram características de predadores devido ao desenvolvimento das armadilhas do tipo anel não constrictor (Figura 3-A), armadilhas do tipo colunas adesivas (Figura 3-B), armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais (Figura 3-C) e armadilhas do tipo redes adesivas bidimensionais (Figura 3-D). Destes quatro isolados, apenas dois isolados puros foram obtidos representando 3,5% do total das amostras examinadas. Os isolados foram denominados de CED e LIN referente às letras iniciais das propriedades em que foram coletadas as amostras de solo.

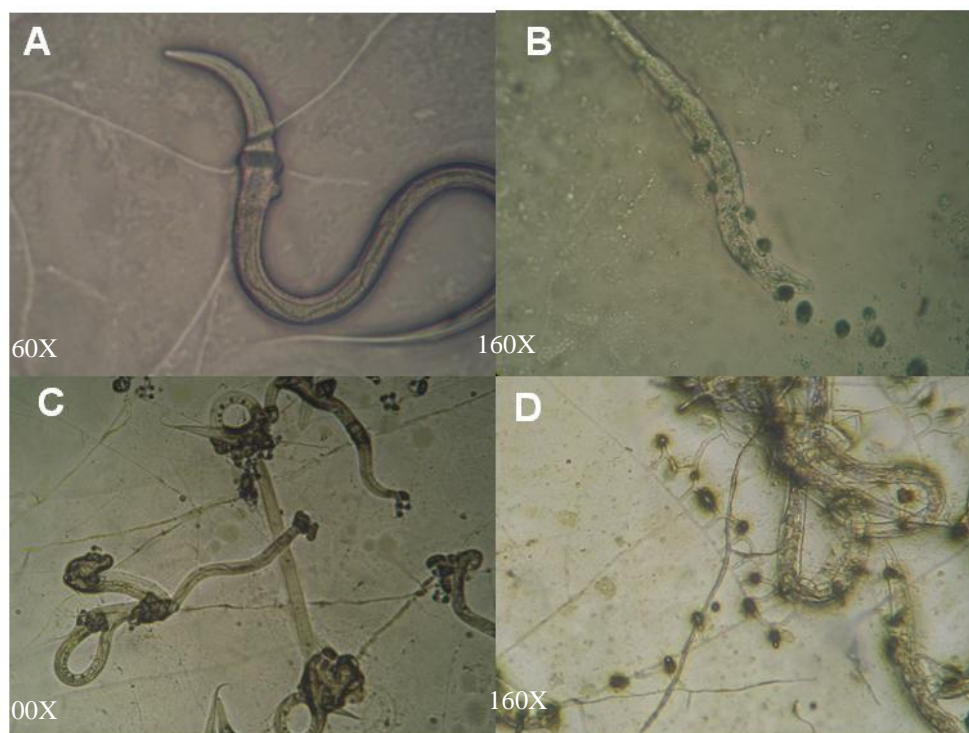


FIGURA 3: Fotomicrografia de fungos isolados do solo em ágar-água 2% mostrando a atividade predatória contra nematóides de vida livre do gênero *Panagrellus* sp. (A) Fungo isolado com armadilha do tipo anel não constritor; (B) Fungo isolado apresentando armadilhas em colunas; (C) Fungo isolado com armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais; (D) Fungo isolado com armadilhas do tipo redes adesivas bidimensionais.

Os dois isolados puros obtidos foram provenientes da região Centro Sul do Estado, caracterizado por apresentar clima subtropical mesotérmico úmido, sem estação seca, com verões frescos e inverno moderado conforme a classificação de Köppen. A temperatura média no mês mais frio no período entre 1976 a 2009 foi de 14 °C, e a temperatura média do mês mais quente neste mesmo período de 20,3 °C (IAPAR, 2009). A precipitação anual varia de 1.400 a 2.000 mm, sendo os meses de abril, maio e agosto os de menor precipitação. A altitude da região é de aproximadamente 1.100 m (MAAK, 1968).

Resultados semelhantes com relação a taxa de isolamento de fungo com atividade predatória contra nematódeos foram encontrados por Eslami et al. (2005) que analisaram 100 amostras de solo e obtiveram três isolados puros, e maiores quando comparado com Ghahfarokhi et al. (2004) em estudo realizado no Irã que isolaram três cepas das 150 amostras de solo representando 2% do total analisado. Dalla Pria et al. (1991) num dos primeiros estudos realizados no Brasil, isolaram 38 fungos nematófagos de 155 amostras de solo de áreas agricultáveis provenientes de diversos estados (CE, SE, ES, MG, MS, SC e RS), sendo a espécie *Arthrobotrys musiformis* mais comumente encontrada em todas as regiões e não verificaram correlação entre o tipo de cultivo nestas áreas nem como tipo de clima e de solo.

Variáveis como temperatura e profundidade do solo, quantidades de matéria orgânica, método de isolamento, podem influenciar na quantidade de isolados obtidos (NORDBRING-HERTZ et al., 2002). No presente trabalho utilizou-se o método de espalhamento de solo, porém contaminações decorrentes dos repiques realizados do meio AA 2% para o meio BDA dificultou a obtenção do isolado puro. Diluições em série das amostras de solo com meio seletivo poderia permitir a obtenção de melhores resultados. Outra possibilidade seria a utilização de técnicas moleculares que mostraram ser eficientes, simples e confiáveis na detecção e identificação de fungos nematófagos em amostras de solo (KELLY et al., 2008), no entanto, a etapa de repicagem é fundamental e pode levar a perdas.

Os dois isolados que apresentaram atividade predatória foram obtidos de amostras de solo coletados em novembro, no final da primavera. A cepa LIN foi proveniente de uma área de pastejo de ovinos e a cepa CED de uma área de integração lavoura-pecuária, onde no inverno alocam-se ovinos, locais considerados ideais para o isolamento de agentes utilizados no controle biológico da verminose em ovinos (KELLY et al., 2009). Além disso, estas áreas apresentavam grande quantidade de matéria orgânica, e também época em que a temperatura do solo encontrava-se mais elevada. Segundo Nordbring-Hertz et al. (2002), os fungos

nematófagos são mais encontrados no final do verão e no outono, possivelmente pela temperatura do solo.

A identificação morfológica pela técnica de microcultivo revelou que a cepa CED apresentava conídios com comprimento que variou de 18,6 a 25,3  $\mu\text{m}$  com largura aproximada de 9,7  $\mu\text{m}$ , os quais são divididos por um septo, sendo que a célula da base é pelo menos duas vezes menor que a célula distal, e as armadilhas formadas eram tridimensionais com cada anel medindo aproximadamente 22,6  $\mu\text{m}$  (Figura 4 e 5).

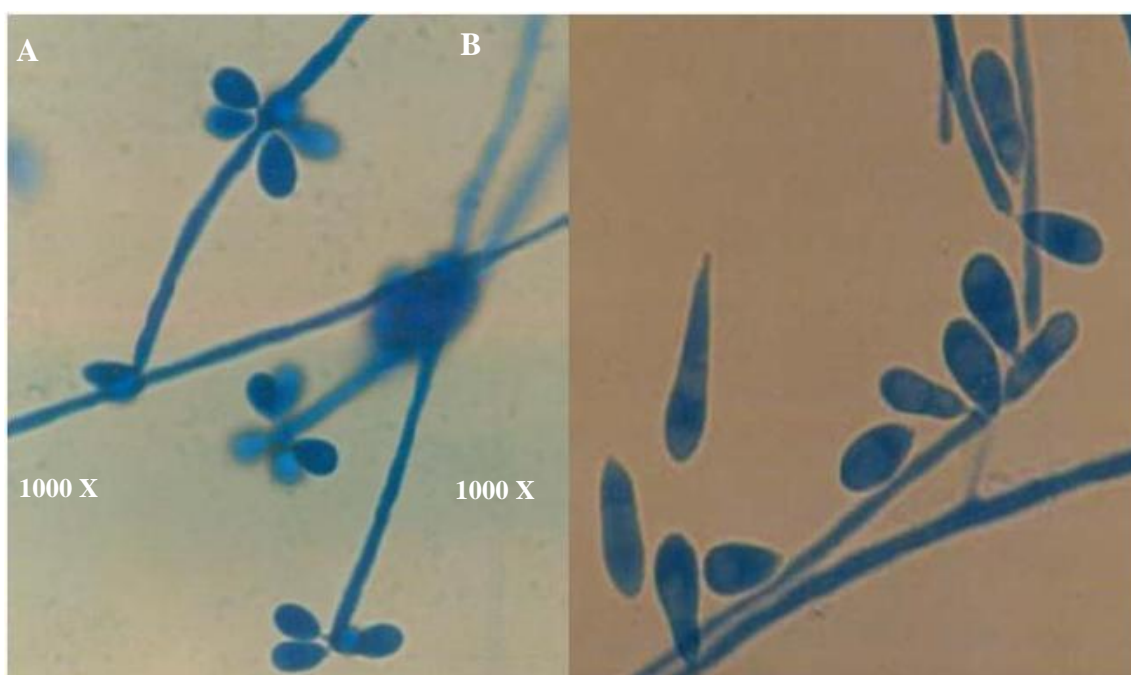


FIGURA 4: Fotomicrografia mostrando os (A) conidióforos e (B) conídios do fungo nematófago CED corado em azul de algodão.



FIGURA 5: Fotomicrografia mostrando as armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais do fungo nematófago codificado CED, corado em azul de algodão.

Segundo Cooke & Godfrey (1964) conídios de *Arthrobotrys conoides* são cônicos, com comprimento de 19 a 42  $\mu\text{m}$  e largura de 8 a 15  $\mu\text{m}$ , constrictos no septo, base achatada, célula distal maior. Já os conídios de *Arthrobotrys oligospora* são ovóides, mais globosos, têm comprimento de 22 a 32  $\mu\text{m}$  e largura de 12 a 20  $\mu\text{m}$ , base apiculada. Para Philip (2002), conídios de *Arthrobotrys oligospora* têm comprimento de 16 a 30  $\mu\text{m}$  e largura de 8 a 16  $\mu\text{m}$ , com célula distal duas vezes maior e são claramente achatados no septo, e as armadilhas apresentam-se diâmetro de 20 a 59  $\mu\text{m}$  característicos do gênero *Arthrobotrys* (PHILIP, 2002).

Oliveira et al. (2002) realizaram a caracterização morfológica e isoenzimática de diversos isolados de fungos nematófagos detectados em várias regiões do Brasil e verificaram que as cepas brasileiras de *Arthrobotrys conoides* apresentavam conídios de 31-44  $\mu\text{m}$  de comprimento e 11-14  $\mu\text{m}$  de largura e o *Arthrobotrys oligospora* com conídios que mediam 17-28  $\mu\text{m}$  com 11 – 14  $\mu\text{m}$  de largura, diferentes daqueles propostos por Cooke & Godfrey (1968) e Philip (2002). Portanto, a identificação morfológica do isolado denominado CED foi sugestiva para as espécies *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys oligospora*.



Como a identificação morfológica da cepa CED não foi conclusiva, foi realizada a amplificação da região ITS do gene rDNA (Figura 6) para o seqüenciamento a análise da sequência foi realizada pelo algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) que mostrou identidade de 97% com a cepa 670 do fungo *A. conoides* (AY773455.1).



FIGURA 6: Produtos amplificados por PCR com os iniciadores V9G e LS266 para a região do espaço interno transcrito (ITS) do gene rDNA CN: Controle negativo de amplificação; CE: Controle negativo da extração do DNA; CED: cepa isolada com DNA nas concentrações de 100 ng e 50 ng; M: Marcador de tamanho Molecular 1Kb (Invitrogen®).

Segundo Li et al. (2005) os fungos nematófagos têm sido classificados com base na morfologia de conídios e conidiófaros desde os primeiros estudos realizados por Dreschler no ano de 1937. Com o avanço das técnicas moleculares tem ocorrido um refinamento na classificação de organismos muito semelhantes morfologicamente, dando destaque á área taxonomia molecular. Por exemplo, a filogenia, com base no seqüenciamento de rDNA e  $\beta$ -

tubulina tem indicado que as estruturas que formam as armadilhas são mais informativas do que as características morfológicas de conídios na taxonomia de fungos nematófagos. Com estes dados agora disponíveis alguns rearranjos na classificação desses fungos foram propostos por esses mesmos autores.

No presente trabalho como o seqüenciamento não apresentou 100% de identidade, outros marcadores deverão ser usados para confirmação definitiva da espécie, pois poderia se tratar de uma espécie nova.

A outra cepa denominada LIN foi identificada como *Arthrobotrys musiformis* pelas características morfológicas dos conídios que apresentavam formato elipsoidal-alongado a musiforme, bicelular com septo inframediano e armadilhas do tipo redes adesivas bidimensionais.

O gênero *Arthrobotrys* tem sido o gênero mais comumente encontrado em diversas regiões do mundo (NORDBRING-HERTZ, 2002) e do Brasil (DALLA PRIA et al., 1991; NAVES & CAMPOS, 1991). Talvez porque consiga utilizar duas fontes de carbono, uma existente na matéria orgânica como saprófita e a outra obtida pela ação predatória contra nematóides tornando-o adaptável a vários habitats (WACHIRA et al., 2009). Este gênero tem atraído muita atenção devido ao seu potencial como possíveis agentes no controle biológico contra nematóides de plantas e animais (ARAÚJO et al., 1999; SANYAL, 2000).

### 3.4 CONCLUSÕES

O método de isolamento utilizado neste trabalho permitiu isolar duas cepas de fungos nematófagos com atividade predatória no Estado do Paraná: *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis*, representando 3,5% das amostras de solo analisadas.

As cepas *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis*, mostraram atividade predatória contra nematóides de vida *Panagrellus* sp.

O isolamento destas duas cepas de fungos nematófagos nos motivou a realizar testes *in vitro* para verificar seu potencial no controle das nematodioses em ovinos.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, N.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215, 403-410, 1990.
- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control “in vitro” of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 46, 197-204, 1994.
- ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. **Vet. Arhiv.** 2, 69-78, 1999.
- COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key of nematode-destroying fungi. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 47, 61-74, 1964.
- DALLA PRIA, M.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. J. Isolamento e identificação de fungos nematófagos de amostras de solo de diversas regiões do Brasil. **Nematol. Bras.** 19, 170-177, 1991.
- ECHEVARRIA, F.A.M.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Vet. Parasitol.** 62, 199-206, 1996.
- ESLAMI, A.; RANJBAR-BAHADORI, S.; ZARE, R.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Vet. Parasitol.** 130, 263–266, 2005.
- GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; HOOG, G. S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Stud. Mycol.** 43,151–162, 1999.
- GHAHFAROKHI, M.S.; ABYANEH, M.R.; BAHADORI, S.R.; ESLAMI, A.; ZARE, R.; EBRAHIMI, M. Screening of soil and sheep faecal samples for predacious fungi: isolation

and characterization of the nematode- trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Ir. Biom. J.** 8, 135–142, 2004.

HEINTZ, C. E. Assesssing the predacity of nematode trapping fungi *in vitro*. **Mycol.** 70, 1086-1100, 1978.

IAPAR. Sistema de monitoramento agroclimático do Paraná. Disponível em: [http://www.iapar.br/arquivos/Image/monitoramento/Medias\\_Historicas/Guarapuava.ht](http://www.iapar.br/arquivos/Image/monitoramento/Medias_Historicas/Guarapuava.ht).

Acesso em 10/08/2010.

KELLY, P.; GOOD, B.; HANHARAN, J. P.; FITZPATRICK, R.; WALL. T D.T. Development and application of a PCR diagnostic assay for the accurate and rapid identification of the nematophagous fungus *D. flagrans*. **Mycol. Res.** 112, 1026-1030, 2008.

KELLY, P.; GOOD, B.; HANHARAN, J. P.; FITZPATRICK, R.; WALL. T. D.T. Screening for presence of nematophagous fungi collects from Irish sheep pastures. **Vet. Parasitol.** 165, 3-4, 345-349, 2009.

KETZIS, J. K.; VERCRUYSE, J.; STROMBERG, B.E.; LARSEN, M.; ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.G.M. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminthes control strategies in ruminants. **Vet. Parasitol.** 139, 321–335, 2006.

LI, Y.; HYDE, K.D.; JEEWON, R. C. L., VIJAYKRISHNA, D.; ZHANG, K.Q. Phylogenetics and evolution of nematode-trapping fungi estimated from nuclear and protein coding genes. **Mycol.** 97 1034–1046, 2005.

MAAK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Estado do Paraná, 1968, 350p.

MANUELI, P.R., WALLER, P.J., FAEDO, M., MAHOMMED, F. Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. **Vet. Parasitol.** 81, 39–45, 1999.

NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. **Nematol. Bras.** 15, 153-162, 1991.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B.; TUNDLID, A. Nematophagous fungi. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Macmillian Publishing Group/www.els.net. pp. 681-690, 2002.

OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S.; ALFENAS, A. C. DIAS-ARIEIRA, C. R. Caracterização morfológica e isoenzimática de espécies de *Arthrobotrys* ocorrentes no Brasil. **Nematol. Bras.** 26, 181-197, 2002.

PHILIP, J. Nematophagous Fungi: Guide by Philip Jacobs, BRIC-Version online, 2002. Acesso em: junho/2008. Disponível em [www.biological-research.com/](http://www.biological-research.com/).

SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematol. Bras.** 15, 121-134, 1991.

SANYAL, P.K. Screening for Indian isolates of predacious fungi for use in biological control against nematode parasite of ruminants. **Vet. Res. Commun.** 24, 55–62, 2000.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E.A. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Vet. Rec.** 139, 421-422, 1996.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Braz. Arch. Biol. and Techn.** 47, 41-47, 2004.

WACHIRA, P.; MIBEY, R.; OKOTH, S.; KIMENJU, J.; KIARIE, J. Diversity of nematode destroying fungi in Taita Taveta, Kenya. **Fungal Ecol.**, 2, 60-65, 2009.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Screening studies. **Vet. Parasitol** 49, 285–297, 1993.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. **Internat. J. Parasitol.** 26, 915–925, 1996.

WALLER, P. J. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminthes control in livestock. **Vet. Parasitol** 139, 1–14, 2006.

WHITE T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. PCR Protocols: A guide to methods and applications. In: **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** Innis M. A., Gelfand D.H., Sninsky J. J., White T. J. (*Eds*). New York, N.Y, Academic Press pp 315-322, 1990.

### CAPÍTULO 3

#### **4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DO FUNGO *Arthrobotrys conoides* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.**

##### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a cinética de crescimento do fungo *Arthrobotrys conoides* em dois resíduos agroindustriais o farelo de trigo e a casca de soja. Para isso, os meios de cultura foram preparados na proporção de 5% para os dois resíduos acrescidos de 1,5% de ágar L<sup>-1</sup>, para cada meio foram realizadas cinco repetições, sendo a quantificação de conídios realizada no décimo dia. Verificou-se que a velocidade de crescimento do fungo em meio contendo casca de soja foi superior (0,50 mm h<sup>-1</sup>) quando comparado com o meio contendo farelo de trigo (0,45 mm h<sup>-1</sup>), porém a produção de conídios em farelo de trigo foi de 2,19 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup> maior quando comparado a casca de soja que foi de 1,13 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** farelo trigo, casca de soja, fungos nematófagos, *Arthrobotrys conoides*



## KINETICS OF GROWTH AND SPORULATION OF *Arthrobotrys conoides* ON AGRO INDUSTRIAL RESIDUES.

### ABSTRACT

This work aimed to study of cinetic growth of the fungus *Arthrobotrys conoides* using two residues as wheat bran and soybean hulls as a substrate. For this, the culture media were prepared at a ratio of 5% for both residue plus 1.5% ágar L<sup>-1</sup>. For each media were five replications. The quantification of spores occurred on the tenth day. It was found that the rate of growth velocity of the fungus in a medium containing soybean hulls was higher (0,50 mm h<sup>-1</sup>) compared with the medium containing wheat bran (0,45 mm h<sup>-1</sup>), however the production of conidia on wheat bran was 2,19 x 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> higher compared to soybean hulls, which was 1,13 x 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>.

**Key-words:** wheat bran, soybean hulls, nematophagous fungi, *Arthrobotrys conoides*.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os fungos nematófagos são classificados como Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Orbiliales e família Orbiliaceae (PFISTER & LIFTIK, 1995). Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzem-se agamicamente por esporos formados sobre ramificações do micélio (DRESCHLER, 1937 citado por MOTA et al. 2003). Mais de 200 espécies de fungos nematófagos estão catalogadas (NORDBRING-HERTZ et al., 2006), os quais são classificados com base no mecanismo de ação, em três grupos: fungos predadores, endoparasitos e parasitos de ovos (BARRON, 1977).

Espécies pertencentes ao gênero *Arthrobotrys* são predadores, os quais formam armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais utilizadas para capturar e digerir suas presas (BARRON, 1977). Estudos realizados com algumas espécies pertencentes a este gênero têm demonstrado grande potencial para serem utilizados no controle biológico de nematóides de plantas (DIAS & FERRAZ, 1994; MAIA et al., 2001; PIMENTEL et al., 2009) e de animais (ARAÚJO et al., 1994; GRAMINHA et al., 2001; ESLAMI et al., 2005).

O conhecimento das características fisiológicas e ecológicas de uma cepa são importantes quando se visa a produção comercial de um agente biológico. A produção de esporos pelos fungos filamentosos é um importante estágio na sua reprodução e consiste na formação e liberação de conidióforos. O ciclo de vida desses fungos se desenvolve em cinco etapas que compreende a dormência dos esporos, germinação, crescimento apical do micélio, conidiogênese e produção conidiosporos. E, para que ocorra desenvolvimento micelial e uma boa conidiogênese é necessário fornecer um meio de cultura que tenham fontes de carbono e nitrogênio assimiláveis. Nesse contexto, os resíduos agroindustriais tem mostrado serem excelentes substratos para o crescimento desses fungos filamentosos, pois são ricos em fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

O processo tecnológico denominado de Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais tem sido bastante explorado, pois além de diminuir possíveis problemas ambientais agregam valor a essas matérias primas, por meio da produção de substâncias de interesse comercial como enzimas, pigmentos, ácidos orgânicos e agentes de controle biológico (PINTO et al., 2005) a um baixo custo (PANDEY, 2003). Dentre os vários microrganismos os fungos filamentosos são os mais adaptados a esse processo pela capacidade de se desenvolverem em quantidade mínima de água (DURAND, 2003).

Portanto, com o intuito de produzir futuramente a cepa nativa de *Arthrobotrys conoides* pelo processo de FES, objetivou-se neste trabalho avaliar a cinética de crescimento e a produção de esporos desta cepa em meio de cultura utilizando resíduos agroindustriais e ágar.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### *4.2.1 Cepa*

Foi utilizada a cepa *Arthrobotrys conoides*, isolada na região Centro Sul do Estado do Paraná. Esta cepa apresentou 97% de identidade pelo algoritmo BLAST com a cepa 670 de *Arthrobotrys conoides*.

### *4.2.2 Substratos Agroindustriais*

Dois subprodutos agroindustriais foram testados para produção de esporos: o farelo de trigo e casca de soja (Figura 1) fornecidos pela Cooperativa Agrária Mista Entre Rios /Guarapuava-PR.



FIGURA 1: Substratos utilizados. (A) – Farelo trigo e (B) – Casca de soja.

#### 4.2.3 Preparo dos Meios de Cultura

Para o teste de cinética de produção, dois meios foram preparados utilizando ágar na concentração de 1,5% com 5% dos resíduos farelo de trigo e casca de soja  $L^{-1}$  (SOCCOL, 2007 – Comunicação pessoal) os quais não foram tamponados. A aferição do pH (Quimis<sup>®</sup>) para o meio com farelo de trigo foi de pH 6,5 enquanto que o meio com casca de soja apresentou pH 6,0. Esses meios depois de preparados foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos e distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Para cada substrato foram realizadas cinco repetições.

#### 4.2.4 Cinética de Crescimento

O material fúngico do *A. conoides* mantido em Corn Meal Agar (CMA), a 4 °C, em ausência de luz, foi inoculado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura Batata Agar Dextrose (BDA) [39 gramas  $L^{-1}$  (HIMEDIA)], e incubadas em estufa tipo BOD (Splabor<sup>®</sup>) a 26 °C por seis dias. Após esse período, discos de cultura de 4 mm foram

retirados das bordas da colônia e repicados para as placas contendo o meio ágar (1,5%) com Farelo de Trigo (5%) e ágar (1,5%) com Casca de Soja (5%), as quais foram incubadas em estufa tipo B.O.D (SpLabor<sup>®</sup>) a 26 °C. A cada 12 horas eram realizadas as medidas utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo<sup>®</sup>) até atingirem a borda da placa de Petri.

#### 4.2.5 Quantificação de Conídios

Após 10 dias de incubação a 26 °C, os esporos foram extraídos de cada placa, com auxílio de um pincel esterilizado, adicionando 8 mL de água destilada com uma gota de Tween 80 estéril. O conteúdo dos tubos foi igualado para 10 mL e após homogeneização, o número de conídios foi determinado em câmara de Neubauer, utilizando os dois lados da câmara, e em triplicata conforme descrito por Nielsen et al. (1991).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de cinética mostrou que a velocidade de crescimento do fungo *Arthrobotrys conoides* em meio contendo 1,5% de ágar e 5% de casca de soja alcançou a borda da placa em menor tempo quando comparado com o meio contendo farelo de trigo (5%) e ágar (1,5%) [Figura 2 e 3].

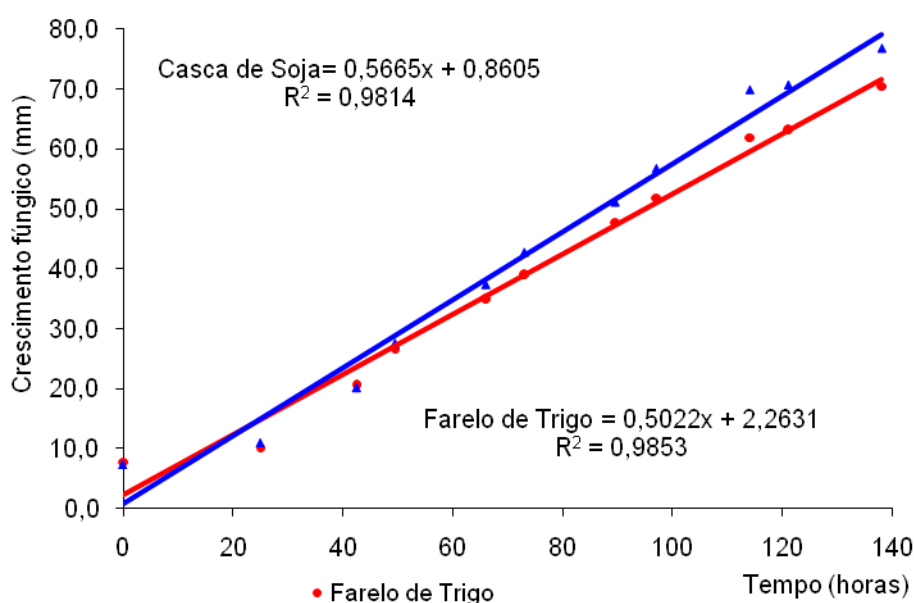


FIGURA 2: Representação gráfica do crescimento linear do fungo *Arthrotrrys conoides* em meio de cultura com 1,5% ágar e 5% de farelo de trigo e em meio de cultura contendo 1,5% de ágar com 5% de casca de soja.

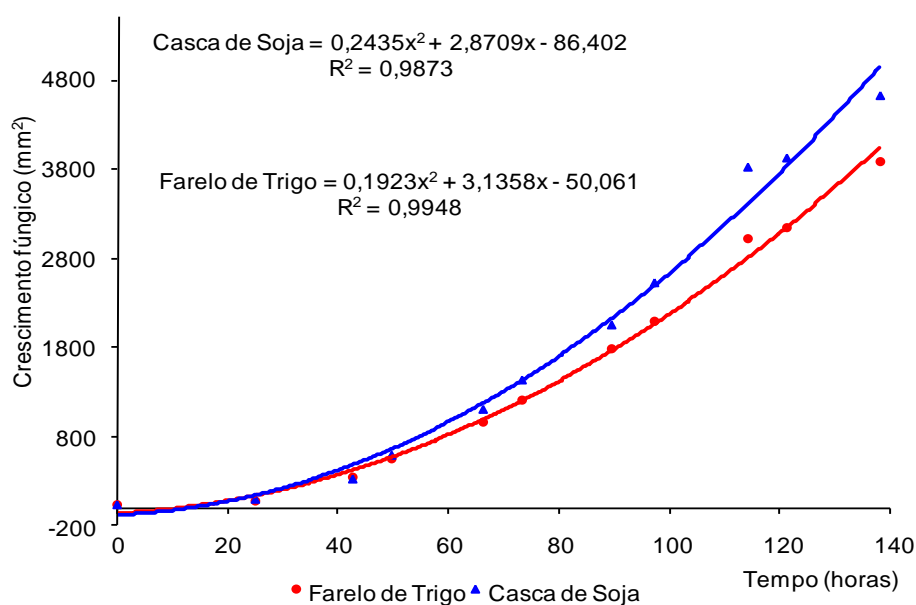


FIGURA 3: Representação gráfica do crescimento por área do fungo *Arthrotrrys conoides* em meio de cultura com 1,5% de ágar com 5% de farelo de trigo e em meio de cultura com 1,5% de ágar com 5% casca de soja.

A velocidade de crescimento radial de uma cepa é constante e caracteriza cada fungo filamentoso expressando sua capacidade em invadir uma superfície sólida em condições experimentais bem precisas (BRAND, 2006). A média da velocidade do *A. conoides* em meio contendo casca de soja foi de 0,50 mm h<sup>-1</sup> enquanto que para o farelo de trigo foi de 0,45 mm h<sup>-1</sup> (Tabela 1). A velocidade de crescimento de uma cepa em determinado meio de cultura está diretamente ligada a facilidade do fungo em utilizar a fonte de carbono presente neste meio (ROUSSOS, 1985).

A quantidade de conídios produzidos em farelo de trigo foi de 2,19 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup> maior quando comparado a casca de soja que foi de 1,13 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, o que mostra que a casca de soja é um substrato de melhor qualidade, pois conforme Bowen et al. (2000) citado por BRAND (2006) quando os parâmetros ambientais e nutricionais se tornam críticos para seu ciclo de vida, os fungos filamentosos iniciam o processo de formação e produção de esporos, denominado de conidiação.

TABELA 1 – Velocidade comparada do crescimento radial (mm/h) do fungo nematófago *Arthrobotrys conoides* cultivados em meio contendo farelo de trigo (5%) com Ágar a (1,5%) e casca de soja (5%) com ágar (1,5%) a 26 °C durante 144 horas.

Substrato	Tempo Horas							
	0	25	50	73	97	121	138	Média
Farelo de Trigo	0,00	0,10	0,67	0,54	0,53	0,48	0,42	0,45
Casca de Soja	0,00	0,15	0,68	0,64	0,58	0,58	0,36	0,50

A cepa *A. conoides* em meio contendo o farelo de trigo desenvolveu mais micélios quando comparado ao meio de cultura com casca de soja (Figura 4), Roussos (1985) relatou que o desenvolvimento micelial e uma boa conidiogênese são condições importantes na produção dos esporos.

Dias & Ferraz (1993) estudaram o crescimento e esporulação de duas cepas de *Arthrobotrys conoides* isoladas no Brasil em cinco diferentes meios (BDA, BDA com Peptona, CMA, Ágar-Fubá e YPSSA) não tamponados e em diferentes pH (4; 5; 6; 7; 8 e 9) e verificaram que as cepas estudadas se desenvolveram melhor em BDA e esporularam melhor em pH inicial 6,0.

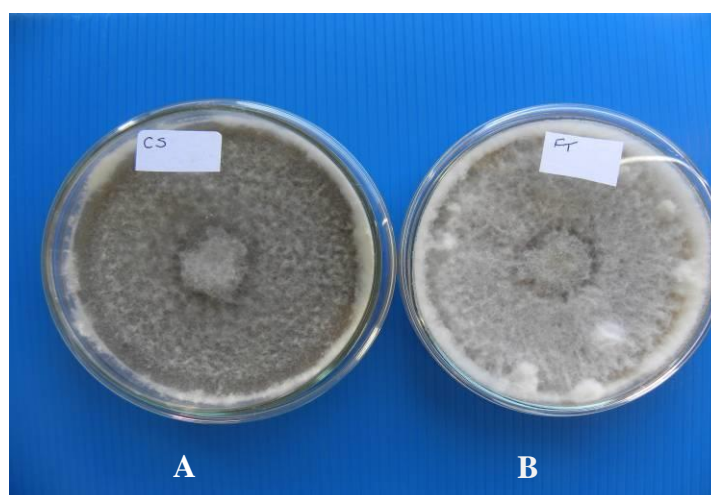


FIGURA 4 – Características macroscópicas observadas do crescimento do fungo *Arthrobotrys conoides* cultivados em meio de cultura contendo (A) 5% casca de soja com 1,5% de ágar e (B) 5% de farelo trigo e 1,5% de Ágar.

Neste trabalho o meio contendo farelo trigo com pH 6,5 mostrou melhor esporulação do que em meio com a casca de soja que apresentou pH 6,0. Todavia, mais estudos são necessários, envolvendo a mesma fonte de carbono, como também a avaliação de outros fatores físicos além do pH. Mankau (1980) relatou que pode haver diferenças de crescimento e esporulação em um mesmo meio de cultura quando comparadas 50 cepas de *A. conoides*, levantando a hipótese que há diferenças de crescimento entre isolados da mesma espécie.



#### 4.4 CONCLUSÕES

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato na produção de esporos de *Arthrobotrys conoides* foi possível e de fácil preparo.

O farelo de trigo foi o resíduo que melhor resultado apresentou na produção de esporos.

Outros estudos com esta cepa de *A. conoides* isolada no Estado do Paraná são necessários para caracterizar sua fisiologia, estudar os fatores físicos e químicos de crescimento com o intuito de otimizar a produção de esporos.

#### 4.5 REFERENCIAS

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control “in vitro” of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 46, 197-204, 1994.
- BARRON, G.L. The nematode-destroying fungi. **Top. Mycobiol.**, 1. Canadian Biological Publications, Guelph, pp 1–140, 1977.
- BRAND, D. **Fisiologia de crescimento e esporulação de fungos nematófagos cultivados em fermentação em estado sólido.** 2006. 187f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná- UFPR, Curitiba.
- DIAS, W. P.; FERRAZ, S. Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. **Nematol. Bras.** 17, 2, 169-181, 1993.
- DIAS, W.P.; FERRAZ, S. Avaliação de espécies de *Arthrobotrys* para o controle de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatol. Bras.** 19, 2, 189-193, 1994.
- DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13, 113-125, 2003.
- ESLAMI, A.; RANJBAR-BAHADORI, S.; ZARE, R.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Vet. Parasitol.** 130, 263–266, 2005.
- GRAMINHA, E.B.N.; MAIA, A.S.; SANTOS, J.M.; CANDIDO, R.C.; SILVA, G.S.; COSTA, A.J. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domesticos. **Sem. Cienc. Agr.** 22, 11–16, 2001.
- MAIA; A. S.; SANTOS, J. M. dos; Di MAURO, A. O. Estudo ‘*in vitro*’ da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatol. Bras.** 26, 4, 732-736, 2001.

- MANKAU, R. Biocontrol fungi as nematode control agents. **J. Nematol.** 12,4, 253-25, 1980.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesq. Vet. Bras.**, 23, 93-100, 2003.
- NIELSEN, L.K.; SMYTH, G.K.; GREENFIELD, P.F. Hemacytometer cell count distributions: implications of non-Poisson behavior. **Biotechnol. Prog.** 7, 560-563, 1991,
- NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. In: **Encyclopedia of Life Sciences**, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester. ,doi:10.1038/npg.els.0004293, <http://www.els.net/>. p.1-11, 2006.
- PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochem. Eng. J.**, 13, 81–84, 2003.
- PFISTER D.H, LIFTIK M.E. Two Arthrobotrys anamorphs from Orbilia auricolor. **Mycol.**, 87, 684–688, 1995.
- PIMENTEL, M. S.; PEIXOTO, A. R.; DA PAZ, C. D. Potencial de controle biológico de Meloidogyne utilizando fungos nematófagos e bactérias em cafeeiros. **Coffee Sci.** 4, 1, 84-92, 2009.
- PINTO, G. A. S; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R.B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado Técnico/EMBRAPA, 2005. Disponível em [www.cnpat.embrapa.br](http://www.cnpat.embrapa.br). Acesso em 20/07/2010.
- SOCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Bioch. Eng. J.** 13, 205-218, 2003.

## CAPÍTULO 4

### 5. ATIVIDADE PREDATÓRIA DE CEPAS NATIVAS DO FUNGO *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis* CONTRA LARVAS INFECTANTES DE TRICOSTRONGILÍDEOS.

#### RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar a resistência de duas cepas nativas isoladas no Estado do Paraná, *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis*, á passagem pelo trato gastrintestinal e a manutenção da sua capacidade predatória *in vitro* sobre diferentes espécies de nematódeos constituído de um *pool* na proporção 64% *Haemonchus* sp; 22% *Trichostrongylus* sp, 14% de *Strongyloides papillosus*. Ambas as cepas mostraram ser resistentes a passagem pelo trato gastrintestinal em ovinos. A atividade predatória *in vitro* para o isolado *Arthrobotrys conoides* atingiu 96,35% de eficiência e para o *Arthrobotrys musiformis* de 85,75%. No outro teste *in vitro* realizado com a adição de diferentes concentrações de conídios o isolado *Arthrobotrys conoides* reduziu 91% de larvas infectantes (L3) quando comparado com o *Arthrobotrys musiformis* (81%). Este estudo demonstrou que os fungos isolados em solo paranaense, possuem um grande potencial para o controle biológico de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes.

**Palavras-chave:** Controle biológico, fungos nematófagos, *Arthrobotrys*, *Haemonchus* sp

**PREDATORY ACTIVITY AGAINST LARVAE OF TRICOSTRONGYLES NATIVE STRAINS OF *Arthrobotrys conoides* AND *Arthrobotrys musiformis*.**

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the resistance of two native strains isolated in Paraná, *Arthrobotrys conoides* and *Arthrobotrys musiformis* their pass through the gastrointestinal tract and the maintenance of their predatory ability in vitro on different species of nematodes consisted of a pool in proportion to 64% *Haemonchus* sp, *Trichostrongylus* sp 22%, 14% of *Strongyloides papillosus*. The test on passing through the gastrointestinal tract in sheep was successfully performed for both strains and the predatory ability of this isolates were evaluated *in vitro* on different species of nematodes consisting of a pool in the following proportion: 64% *Haemonchus* sp, 22% *Trichostrongylus* sp, 14% *Strongyloides papillosus*. The predatory activity the isolate *Arthrobotrys conoides* reached 96.35% and for *Atrhrobotrys musiformis* 88.75%. Other *in vitro* test with different conidia concentration the strains *Arthrobotrys conoides* reduced 91% of infective larvae (L3) when compared with *Atrhrobotrys musiformis* (81%). The present study demonstrated that fungus isolated from the Parana soil has a great potential for biological control in gastrointestinal nematodioses in ruminants.

**Keywords:** biological control, nematophagous fungi, *Arthrobotrys conoides*, *Haemonchus* sp.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O controle biológico utilizando fungos nematófagos apresenta-se como um dos métodos alternativos no controle da verminose em ovinos (THAMSBORG et al., 1999). Esses fungos parecem ter melhor atividade em fezes frescas, onde se desenvolvem os diferentes estádios dos parasitos (de ovo até larvas infectantes), antes de migrarem para a pastagem. Desta forma, há necessidade de determinar quais espécies fúngicas são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) dos animais, germinarem nas fezes e capturar larvas infectantes dos nematódeos parasitos (GOMES et al., 1999), principalmente quando se visa à possibilidade de desenvolver formulações de uso oral.

Testes *in vitro* têm sido realizados com diferentes isolados após passagem pelo TGI com resultados positivos. Araújo et al. (2004) verificaram que o fungo *Monacrosporium sinense* é resistente à passagem pelo TGI de bovinos e mantém sua capacidade predatória sobre larvas infectantes de trichostrongilídeos com eficácia de 69,9%. Melo et al. (2003) administraram conídios de *Monacrosporium thaumasium* a caprinos e recuperaram o fungo 21 e 24 horas após administração por via oral, mantendo sua atividade predatória sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Waller et al. (1994) demonstraram que os conídios de *Arthrobotrys* spp. são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos e verificaram que a redução das larvas nas fezes estava relacionada com a concentração de conídios e, desse modo, grandes números foram requeridos para mostrar maior efetividade. Porém, Gronvold et al. (1993) estudaram alguns isolados de *Arthrobotrys oligospora* e verificaram que nem todos os fungos sobrevivem a passagem pelo TGI de ovinos, caprinos e bovinos sugerindo que há diferenças entre isolados de uma mesma espécie.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência a passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos de dois isolados nativos do Estado do Paraná, *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis*, e a manutenção da sua capacidade predatória *in vitro*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Produção de Conídios para o Teste de Passagem pelo Trato Gastrointestinal de Ovinos e Testes *in vitro*

Discos de 4 mm de diâmetro contendo material fúngico do *Arthrobotrys conoides* e da cepa *Arthrobotrys musiformis* mantidos em Corn meal Agar [CMA- Difco® (17 g L<sup>-1</sup>)], a 4 °C, em ausência de luz, foram transferidos para placas de Petri contendo o meio Agar Batata Dextrose (BDA) [Himedia® - 39 g L<sup>-1</sup>) e incubadas a 26 °C por 6 dias. Após esse período, discos de 4 mm foram retirados das bordas destas culturas e inoculados em 10 placas de Petri de 9 cm de diâmetro, para cada cepa, contendo o meio de cultura na proporção de 1,5% de ágar com 5% de farelo de trigo as quais foram incubadas a 26 °C por 10 dias. Após este período foram adicionados em cada placa 6 mL de água destilada esterilizada acrescido de uma gota de Tween 80, e as superfícies das placas foram lavadas com auxílio de um pincel esterilizado para extração do conídios conforme descrito por Araújo et al. (1994), acondicionados em tubos de vidro estéril, e quantificados em câmara de Neubauer, utilizando os dois lados da câmara, e em triplicata conforme descrito por Nielsen et al. (1991).

### 5.2.2 Animais

Foram utilizados seis cordeiros, machos, com seis meses de idade, mestiços Ile de France com Corriedale, com peso médio de 30 Kg, previamente vermifugados com Moxidectina 0,2% (Cydectin® - Fort Dodge) na dose de 0,2 mg Kg<sup>-1</sup>. Estes animais foram divididos em três grupos de dois animais cada e alocados em baias individuais, com piso

cimentado, onde permaneceram durante o período experimental. A dose de  $1,0 \times 10^5$  conídios  $\text{Kg}^{-1}$  de peso vivo (PV) foi estipulada com base na quantidade total de conídios produzidos. No grupo 1 – foi administrada, por via oral, a dose de  $1,0 \times 10^5$  esporos  $\text{Kg}^{-1}$  PV da cepa *Arthrobotrys conoides* diluídos em 10 mL de água destilada esterilizada; o grupo 2- foi administrada, por via oral, a mesma dose de  $1,0 \times 10^5$  esporos  $\text{Kg}^{-1}$  PV da cepa *Arthrobotrys musiformis* e no grupo 3 (controle), foram administrados 10 mL de água destilada esterilizada, via oral. Cinco dias antes da inoculação de esporos e durante todo período experimental os animais foram alimentados com silagem de milho, ração e água autoclavados.

### 5.2.3 Teste de Passagem pelo Trato Gastrintestinal

Para descartar a presença de fungos nas fezes dos animais antes do experimento e avaliar a presença do fungo após a administração dos tratamentos, amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto dos animais e acondicionadas em sacos plásticos nos horários: 3 horas antes e 12, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após a inoculação dos esporos aos animais. Dois gramas destas amostras foram macerados com bastão de vidro estéril e espalhadas sobre placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo ágar-água 2%, e gotejadas sobre elas um número aproximado de três mil larvas de *Panagrellus* sp, para estímulo do crescimento dos fungos e do desenvolvimento das armadilhas (ARAÚJO, et al. 2003). As placas foram feitas em duplicatas para cada horário de colheita.

Estas placas foram vedadas com Parafilm e incubadas a 26 °C e em ausência de luz. Diariamente, por um período de 20 dias, estas placas foram inspecionadas em microscópio estereoscópico (Tecnival®) para visualização de armadilhas, conidiófaros, conídios dos isolados e nematóides predados na superfície das placas.

### 5.2.4 Teste *in vitro* das Cepas *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis* Após Passagem pelo Trato Gastrintestinal



Foram realizados dois tipos de teste *in vitro*: em placas de Petri e o outro em coproculturas com adição de várias concentrações de conídios.

#### 5.2.4.1 Teste *in vitro* em placas de Petri

##### a) Obtenção e identificação das larvas infectantes

Foram colhidas fezes diretamente da ampola retal de ovinos naturalmente infectados por helmintos gastrintestinais. Coproculturas com 20 gramas de fezes foram realizadas em copos de vidro misturadas a vermiculita esterilizada na proporção 1:1, conforme descrito por Roberts & O'Sullivan (1950) e incubadas a temperatura de 28 °C. Após 10 dias as larvas infectantes foram recuperadas pelo método de Baermann. Para que os nematóides estivessem livres de bactérias fecais, as larvas foram lavadas sete vezes com água destilada e centrifugadas a 72,67 g durante 10 minutos, desprezando-se sempre ao final de cada centrifugação o sobrenadante. Em seguida, os nematóides permaneceram em uma solução contendo 0,05% de sulfato de estreptomicina, 0,05% de cloranfenicol e mantidos “overnight”. O processo de lavagem foi repetido novamente como descrito anteriormente (ARAÚJO et al., 1994). Antes de adicioná-las às placas, as larvas foram contadas e identificadas de acordo com os critérios descritos por Van Wyk et al. (2004), e se encontravam na proporção de 64% *Haemonchus* sp, 22% *Trichostrongylus* sp e 14% *Strongyloides papillosus*

##### b) Teste *in vitro*

Após passagem pelo trato gastrintestinal dos animais e reisolamento dos fungos nas fezes com posterior identificação morfológica conforme chave de Cooke & Godfrey (1964) e Philip (2000), as culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura CMA.

O teste *in vitro* foi realizado em placas de Petri com 8 cm de diâmetro preenchidas com ágar-água (AA) 2%. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos, um com o fungo *Arthrobotrys conoides* e o outro com o fungo *Arthrobotrys musiformis* e um controle, com cinco repetições cada.

Disco de cultura de cada cepa foi retirado do tubo de ensaio onde eram mantidas em meio CMA [Difco (17 g L<sup>-1</sup>)], e repicadas em placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio de cultura BDA e mantidos em incubação a 26 °C durante 6 dias. Após esse período, um disco de cultura de mais ou menos 4 mm foi transferido para as placas contendo ágar-água a 2%. Estas placas foram incubadas em estufa BOD (Splabor®) a 26 °C, por 6 dias, em ausência de luz. No sexto dia, foram adicionados 350 µL de uma suspensão com aproximadamente 1000 larvas infectantes de terceiro estágio de tricostrongilídeos (L3) na proporção de 64% *Haemonchus* sp, 22% *Trichostrongylus* sp e 14% *Strongyloides papillosus*.

O grupo controle foi constituído por placas de Petri contendo ágar-água 2% sem o fungo e adicionado 350 µL de uma suspensão de 1000 L3. Todas as placas foram novamente incubadas a 26 °C, por mais 6 dias, em ausência de luz. No sexto dia de interação do fungo com as L3, as placas foram retiradas da estufa e o ágar retirado das placas com auxílio de uma espátula metálica e submetido ao método de Baermann por 6 horas conforme descrito Araújo et al. (1994) e realizada a contagem e identificação das larvas como descrito por Van Wyk (2004).

Para a contagem das larvas o conteúdo dos tubos foi igualado para 1 mL e o número de larvas estimado em cinco alíquotas de 50 µL extrapolando-se para o volume dos tubos. A taxa de predação foi estimada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução} = (XC - XT) / XC \times 100,$$

Onde,

XC= média do número larvas recuperadas no grupo controle

XT= média do número de larvas recuperadas no grupo tratado

#### 5.2.4.2 Teste **in vitro** realizado em coproculturas com adição de conídios em diferentes concentrações

Este teste foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu no teste com a cepa *Arthrobotrys conoides*. Para este teste foram colhidas fezes diretamente da ampola retal de vários ovinos adultos naturalmente infectados por helmintos gastrintestinais. Em seguida, todas as amostras foram misturadas e quatro exames foram processados para a contagem de ovos helmintos por grama de fezes (OPG) para confirmar a infecção, onde a média encontrada foi de 1162 OPG.

A segunda etapa consistiu no teste com a cepa *A. musiformis* seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, cuja média encontrada foi 762 OPG. Em ambos os testes foram formados 5 grupos conforme a concentração de conídios (0, 1.000, 10.000, 50.000, e 100.000 conídios g<sup>-1</sup> de fezes) com 4 repetições cada. No grupo controle os conídios não foram inoculados.

Nas duas etapas foram realizadas coproculturas com 20 gramas de fezes misturadas a vermiculita estéril na proporção 1:1, umedecidas com água destilada esterilizada e acondicionadas em copos de vidro estéreis conforme descrito por Roberts & O'Sullivan (1950).

Os conídios foram produzidos em placas de Petri em meio de cultura composto por Agar (1,5%) e farelo de trigo (5%) L<sup>-1</sup>. A quantificação de conídios foi realizada em câmara de Neubauer utilizando os dois lados da câmara, e em triplicata conforme descrito por Nielsen et al. (1991). Após a adição dos conídios, as coproculturas foram incubadas em estufa BOD (Spalabor®) a 28 °C por 7 dias. As larvas foram extraídas pelo método de Baermann conforme

descrito por Eslami et al. (2005). Para a contagem do número total de larvas o conteúdo dos tubos foi igualado para 1 mL e o número de larvas estimado em cinco alíquotas de 50 µL extrapolando-se para o volume dos tubos. As larvas infectantes dos helmintos gastrintestinais de ovinos foram identificadas de acordo com os critérios descritos por Van Wyk et al. (2004).

### 5.2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo programa de estatística SANEST, e submetidos a análise da variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de passagem pelo trato gastrintestinal, a pesquisa para a presença de alguma estrutura fúngica, foi negativa nas amostras fecais colhidas 3 horas antes da administração dos esporos em todos os grupos. No grupo controle, após a administração do placebo, todas as amostras pesquisadas foram negativas durante o período experimental.

Nos grupos experimentais foram visualizados nematóides predados na superfície das placas inoculadas com fezes colhidas dos animais. Dos dois animais em que foram inoculados esporos da cepa *A. conoides*, somente um animal teve o fungo recuperado nas fezes após 12 horas da inoculação. O outro animal deste grupo apresentou vômitos e diarreia o que provavelmente interferiram na dinâmica de eliminação dos esporos. Nos animais que receberam os esporos da cepa *A. musiformis*, em ambos foram recuperados 12 e 24 horas após inoculação. Portanto, as duas cepas testadas foram resistentes a passagem pelo trato gastrintestinal, que é um dos fatores importantes na seleção de uma cepa para ser utilizada em

programas de controle biológico, pois segundo Larsen (1999) o melhor local de atividade dos esporos é nas fezes frescas.

Trabalhos realizados com o fungo *Dunndingtonia flagrans*, mostraram que há uma variabilidade no tempo de recuperação deste fungo após a administração oral. Larsen et al. (1998) isolaram o fungo das fezes de ovinos no intervalo de 12 - 48 horas da administração oral de clamidósporos na dose de  $2,2 \times 10^5 \text{ Kg}^{-1}$  peso vivo. Campos et al. (2009) relataram que a quantidade administrada parece não ser um fator determinante na dinâmica de eliminação do fungo e que fatores relacionados a dieta como quantidade e qualidade da fibra, consumo de água e forma da partícula dos alimentos podem influenciar na dinâmica de eliminação de conídios.

Gronvold (1993) estudou alguns isolados de *A. oligospora* e observou que nem todos sobrevivem à passagem pelo trato gastrointestinal em bovinos, caprinos e suínos, entretanto outros isolados dessa mesma espécie resistem à passagem pelo trato gastrointestinal em ovinos (WALLER et al., 1994) e bovinos (HASHIMI & CONAN, 1989), mostrando que existem diferenças entre isolados da mesma espécie (NAVES & CAMPOS, 1991).

Quando avaliado a atividade predatória *in vitro* em placas de Petri, contra larvas de trichostrongilídeos verificou-se que o isolado *A. conoides* apresentou eficácia de 96,35% e a cepa *A. musiformis* 85,75% (Tabela 1), portanto mantiveram a atividade predatória. Constatou-se também que os isolados fúngicos testados não foram seletivos para os gêneros de helmintos utilizados no experimento (Tabela 2), pois predaram os três gêneros testados: *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Strongyloides papillosus*.

TABELA 1: Valores médios do número de larvas infectantes de trichostrongilídeos (L3) recuperadas pelo método de Baermann após seis dias de incubação no teste *in vitro* realizados em placas de Petri com os fungos *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis* após passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos e percentagem de redução em relação ao controle.

Grupos	Larvas nematóides	
	Média (placa)	Redução (%)
<i>A. conoides</i>	26,4 b	96,35
<i>A. musiformis</i>	103,2 b	85,75
Controle	724 a	----

Letras diferentes (a ; b) indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,01$ ).

TABELA 2: Número e percentagem de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus* sp, *Trichostrongylus* sp e *Strongyloides papillosus* recuperadas no teste *in vitro* realizado em placas de Petri após passagem pelo trato gastrintestinal no início (dia zero) e seis dias após administração de esporos por via oral.

Larvas nematódeos	Inicial	Final		
		Controle	<i>Arthrobotrys musiformis</i>	<i>Arthrobotrys conoides</i>
<i>Haemonchus</i> sp	640 <sup>1</sup> (64) <sup>2</sup>	420 (58)	65,0 (63)	16,8 (64)
<i>Trichostrongylus</i> sp	220 (22)	181 (25)	25,8 (25)	5,0 (19)
<i>Strongyloides papillosus</i>	140 (14)	123 (17)	12,4 (12)	4,5 (17)
Total	1000	724	103,2	26,4

<sup>1</sup> numero de larvas, <sup>2</sup> percentagem de larvas

No Brasil, resultados diferentes foram encontrados por Graminha et al. (2001) em testes *in vitro*, que demonstraram maior eficácia para o *Arthrobotrys musiformis* (94,44%) quando comparado ao *Arthrobotrys conoides* (89,39%) contra larvas de *Haemonchus contortus*.

Naves & Campos (1991) relataram grande diversidade na capacidade predatória de diferentes isolados dentro de uma mesma espécie como também entre espécies de *A. conoides* e *A. musiformis*. Desta forma, técnicas moleculares mostram-se de grande importância na caracterização genética das cepas e, conseqüentemente, auxiliará na seleção das melhores espécies de fungos nematófagos com vistas à obtenção de um produto comercial.

No teste realizado em coproculturas com diferentes concentrações de conídios verificou-se que a espécie *A. conoides* apresentou 89% de redução quando adicionado 100.000 conídios enquanto o *A. musiformis* apresentou redução de 71% (Tabela 3), sendo a espécie *Haemonchus* sp encontrada em maior proporção (90%) seguida pela espécie *Trichostrongylus* sp (10%). Pela análise de regressão linear a estimativa do número de conídios g<sup>-1</sup> de fezes da cepa *A. conoides* para obtenção de 100% de redução seria de 111.837 conídios e para a cepa *A. musiformis* 164.830 conídios g<sup>-1</sup> de fezes (Figura 1 e 2).

No teste *in vitro* realizado em coproculturas com adição de várias concentrações de conídios foi possível observar uma correlação direta entre o número de conídios e o número de larvas predadas. Eslami et al. (2005), no Irã, também encontraram resultados semelhantes com uma cepa nativa da espécie *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* demonstrando correlação direta entre o número de conídios e a redução de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

TABELA 3: Atividade predatória de fungos em teste *in vitro* realizado em coproculturas com diferentes concentrações de conídios das cepas *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis*, representadas em número de larvas infectantes de tricostrongilídeos recuperadas pelo método de Baermann e percentagem de redução após sete dias de incubação a 28 °C.

Conídios	<i>A. conoides</i>		<i>A. musiformis</i>	
	Larvas L3	% Red.	Larvas L3	% Red.
0 (controle)	4035 A	0	499 a	0
1.000	3847 A	5,4	246 b	46
10.000	2697 B	32,9	210 bc	57
50.000	1210 c	70,8	195 bc	62
100.000	795 d	81	153 c	71
Média	2517	38	261	47
C.V.(%)	5,4		8,7	

Análise com transformação dos dados (raiz quadrada de x). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Redução em relação a dose Zero de esporos.

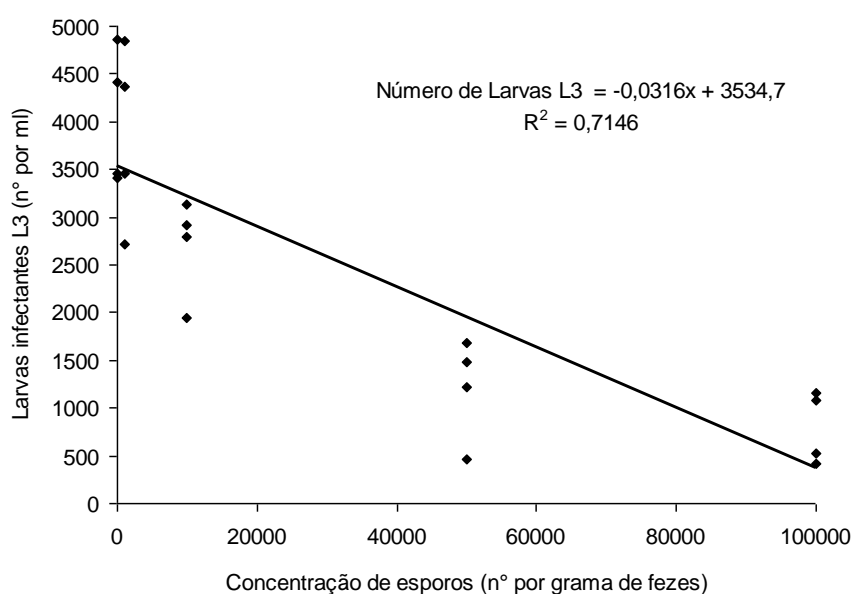


FIGURA 1: Representação gráfica da atividade predatória, da cepa *Arthrobotrys conoides* em teste *in vitro* realizado em Larvas de tricostrongilídeos em coproculturas com diferentes concentrações de conídios após sete dias de incubação a 28 °C.



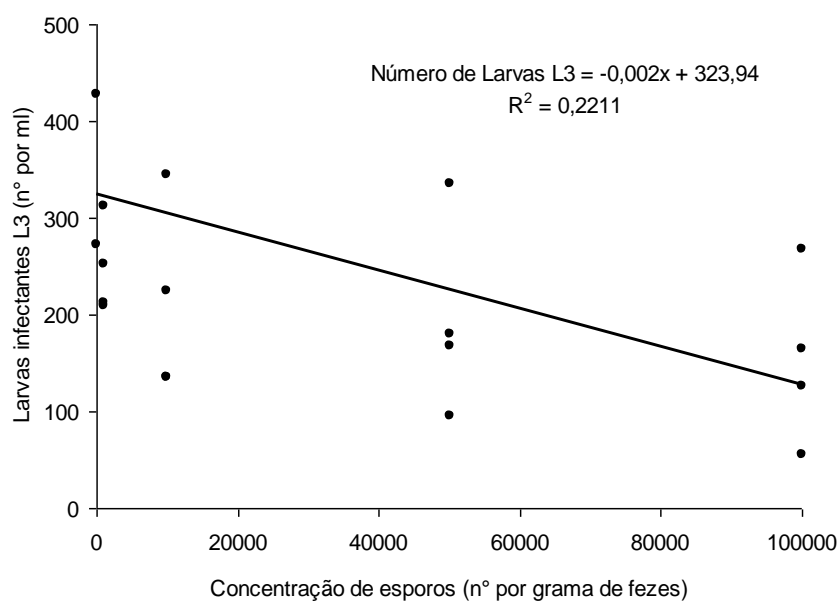


FIGURA 2: Representação gráfica da atividade predatória da cepa *Arthrobotrys musiformis*, em teste *in vitro*, realizado em larvas obtidas em coproculturas com diferentes concentrações de conídios após sete dias de incubação a 28 °C.

## 5.4 CONCLUSÕES

As duas espécies de fungos nativos e isolados no Estado Paraná, *A. conoides* e *A. musiformis*, mostraram ser resistentes a passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos, mantendo a atividade predatória contra nematódeos.

O fungo *Arthrobotrys conoides* apresentou no teste *in vitro* em placas de petri, maior redução no número de larvas de trichostrongilídeos (96,35%), enquanto que o isolado *Arthrobotrys musiformis* apresentou 85,75% de redução.

No teste *in vitro* realizado em coproculturas com adição de  $10^5$  conídios g<sup>-1</sup> de fezes, o *A. conoides* apresentou maior redução no número de larvas infectantes de trichostrongilídeos (81%) quando comparado com o fungo *A. musiformis* que apresentou 71% de redução.

Os isolados fúngicos testados não foram seletivos para os gêneros de helmintos utilizados no experimento (*Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus* sp e *Strongyloides papillosus*).

## 5.5 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control “in vitro” of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 46, 197-204, 1994.
- ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; ALVES, P.H.; CAMPOS, A.K.; GANDRA, J.R. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 56, 467-471, 2004.
- ARAÚJO, J. A.; RIBEIRO, R. R. A atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 12, 2, 76-81, 2003.
- CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M.P.; DIAS, A.S. Resistance of different fungi structures of *Dunndingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. **Parasitol. Res.** 105, 913-919, 2009.
- COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key of nematode-destroying fungi. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 47, 61-74, 1964.
- ESLAMI, A.; RANJBAR-BAHADORI, S.; ZARE, R.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Vet. Parasitol.** 130, 263–266, 2005.
- GOMES, A.P.S.; ARAÚJO, J.A.; RIBEIRO, R.C.F. Differential *in vitro* pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. **Braz. J. Med. Bio. Res.** 32, 79-83, 1999.

GRAMINHA, E.B.N.; MAIA, A.S.; SANTOS, J.M.; CANDIDO, R.C.; SILVA, G.S.; COSTA, A.J. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domesticos. **Sem. Cienc. Agr.** 22, 11–16, 2001.

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: A survey of Danish studies. **Vet. Parasitol.** 48, 311- 325, 1993.

HASHIMI, H.A.; CONNAN, R.M. Biological control of ruminant trichostrongylids by *Arthrobotrys oligospora* predaceous fungus. **Parasitol. Tod.** 5, 28 -30, 1989.

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P. J.; HENNESSY, D.R. The potencial of nematophagous fungo to control the free-living stage of nematode parasite of sheep: studies with *Dunndingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.** 76, 121-128, 1998.

LARSEN, M. Biological Control of Helminths. **Int. J. Parasitol.** 29, 139-146, 1999.

MELO, L. M. ; BEVILAQUA, C. M. L.; ARAÚJO, J. V.; MELO, A. C. F. L. Atividade predatória do fungo *Monascrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus* após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. **Cienc. Rural.** 33, 169-171, 2003.

NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. **Nematol. Bras.** 15, 153-162, 1991.

NIELSEN, L.K.; SMYTH, G.K.; GREENFIELD, P.F., Hemacytometer cell count distributions: implications of non-Poisson behavior. **Biotech. Prog.** 7, 560-563, 1991.

ROBERTS, F.H.S.; O’SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting tract of cattle. **Austr. J. Agr.** 1, 6-7, 1950.

- THAMSBORG, S.M.; POEPSTORFF, A.; LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. **Vet. Parasitol.** 84, 169-186, 1999.
- VAN WYK, J.A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Vet. Parasitol.** 119, 277-306, 2004.
- WALLER, P.J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENNESSY, D.R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: *In vitro* and in vivo studies. **Vet. Parasitol** 51, 289-299, 1994.

## CAPÍTULO 5

### **6. CARACTERÍSTICAS DA ATIVIDADE PREDATÓRIA DO FUNGO *ARTHROBOTRYS CONOIDES* SOBRE LARVAS INFECTANTES DE *HAEMONCHUS* SP POR MEIO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.**

#### **RESUMO**

Os fungos nematófagos são classificados com base no seu mecanismo de ação em predadores, endoparasitos e parasitos de ovos. Espécies pertencentes ao gênero *Arthrobotrys* são classificados como predadores e têm sido estudados como uma alternativa promissora para o uso no controle biológico das nematodioses em pequenos ruminantes. A microscopia eletrônica de varredura tem sido considerada uma ferramenta para o estudo do mecanismo de interação desses fungos com suas presas. Portanto, objetivou-se neste trabalho analisar a interação entre uma cepa nativa do *Arthrobotrys conoides* isolada no Estado do Paraná, com larvas infectantes de *Haemonchus* sp por meio da microscopia eletrônica de varredura. Todo o processo de predação foi observado desde as formações de armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais, captura, prolongamento no bulbo de infecção do fungo sugerindo ser utilizado para perfurar a cutícula do nematóide no momento da penetração do fungo, diminuição do turgor e a presença da hifa no interior do corpo da larva. A microscopia eletrônica de varredura possibilitou observar claramente a atividade predatória da cepa de *Arthrobotrys conoides* contra larvas infectantes de *Haemonchus* sp.

**Palavras – chave:** *Arthrobotrys conoides*, fungos nematófagos, controle biológico

**STUDY OF THE PREDATORY ACTIVITY OF THE FUNGUS *ARTHROBOTRYS CONOIDES* ON INFECTIVE LARVAE OF *HAEMONCHUS* SP USING AS TOOL THE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY.**

**ABSTRACT**

Nematophagous fungi are classified based on their mechanism of predation as predators, parasites and endoparasites of eggs. Species of the genus *Arthrobotrys* are classified as predators and have been studied as a promising alternative for use in biological control nematodiosis in small ruminants. The scanning electron microscopy has been considered a tool to study the mechanism of interaction of these fungi with their prey. Therefore, the aim of this work were to analyze the interaction between a native strain of *Arthrobotrys conoides* isolated in Paraná, with infective larvae of *Haemonchus* sp by means of scanning electron microscopy. The whole process of predation was observed during the formation of traps dimensional adhesive networks, capture, extending the bulb of the fungus suggests be used to pierce the cuticle of the nematode in the moment of penetration of the fungus, decreased turgor and the presence of hyphae inside the body of the larvae. The scanning electron microscopy allowed to observe clearly the strain of the predatory activity of *Arthrobotrys conoides* against infective larvae of *Haemonchus* sp.

**Key-words:** *Arthrobotrys conoides*, nematophagous fungi, biologic control.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O problema de resistência dos parasitos a vários anti-helmínticos tem ocasionado grandes perdas na produção de pequenos ruminantes principalmente em decorrência da haemoncose (VATTA et al., 2001; KAHN et al., 2007).

A utilização de fungos nematófagos no controle biológico das nematodioses em pequenos ruminantes tem gerado grande expectativa de se tornar disponível para serem utilizados em manejos integrados num futuro próximo (PEÑA et al., 2002; FONTENOT et al., 2003; WALLER et al., 2004; LARSEN, 2006; MAINGI et al., 2006).

Vários trabalhos têm sido realizados com o fungo *Dunndingtonia flagrans* (FERNANDEZ et al., 1999; FAEDO et al., 2000; CHANDRAWATHANI et al., 2004; EPE et al., 2009 ), sendo poucos os estudos realizados com cepas nativas (MANUELLI, et al., 1999 ; SANYAL, 2000) que é fundamental devido a sua fácil adaptabilidade.

Uma das etapas para selecionar uma cepa é a caracterização do processo de interação do fungo contra nematóides (MENDONZA-DE-GIVES et al., 1999), e a microscopia eletrônica de varredura poderia ser uma ferramenta capaz de mostrar esta interação entre presa e predador bem como os mecanismos de predação utilizados (NORDBRING- HERTZ, 1988).

Desta forma, objetivou-se neste trabalho estudar a interação de uma cepa nativa do *Arthrobotrys conoides* contra larvas infectantes de *Haemonchus* sp utilizando a microscopia eletrônica de varredura.



## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 *Obtenção das Larvas Infectantes de Haemonchus sp*

Fezes de ovinos infectados com nematódeos foram colhidas diretamente da ampola retal para realização do exame coproparasitológico. Após a constatação da presença de ovos de trichostrongilídeos foram realizadas coproculturas com 20 gramas de fezes misturadas a vermiculita esterelizada na proporção 1:1 (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950) e incubadas a temperatura de 28 °C. Após 10 dias as larvas infectantes (L3) foram recuperadas pelo método de Baermann e para evitar contaminação bacteriana foram lavadas sete vezes com água destilada e centrifugadas a 72.67 g durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante ao final de cada centrifugação. Posteriormente, os nematóides permaneceram em uma solução contendo 0,05% de sulfato de estreptomicina, 0,05% de cloranfenicol e mantidos “overnight”. O processo de lavagem foi repetido novamente como descrito anteriormente (ARAÚJO et al., 1994). Para a contagem das larvas, o conteúdo dos tubos foi igualado para 1 mL e o número de larvas estimado em cinco alíquotas de 50 µL extrapolando-se para o volume dos tubos.

### 6.2.2 *Microscopia eletrônica varredura (MEV)*

A preparação do material para observação da interação entre larva e fungo em MEV, foi realizada conforme técnica descrita por Nordbring-Hertz (1983) e Campos et al. (2008). Membranas de diálise (Sigma<sup>®</sup>) foram recortadas com diâmetro de 6 cm e acondicionadas em erlenmeyer com água destilada e autoclavadas por 15 minutos a 121 °C. Após autoclavadas, essas membranas foram colocadas em seis placas de Petri com diâmetro de 6 cm contendo o meio Agar-água 2% (AA), de forma que a membrana cobrisse toda a extensão da placa e ficasse com suas bordas aderidas à parede e, em seguida foram seladas com o meio AA 2%, evitando que as larvas passassem para baixo da membrana de diálise (CAMPOS et al., 2008).

Foram retirados das bordas da colônia do *A. conoides* crescidas em meio BDA, um fragmento de aproximadamente 5 mm, para cada placa, e repicadas para aquelas placas com a membrana de diálise e incubadas a 26 °C, na ausência de luz (NORDBRING-HERTZ, 1983). Após 4 dias de incubação as placas foram retiradas da incubadora e adicionado uma suspensão de 50 µL com aproximadamente 500 larvas de terceiro estágio de *Haemonchus* sp. Outras seis placas de Petri com AA 2% sem o fungo foram utilizadas para avaliar a viabilidade das larvas. Nas primeiras 8 horas as placas foram observadas em microscópio óptico em objetiva de 10x e 40x (Bioval<sup>®</sup>), de hora em hora, após foram observadas com 12, 18, 24 e 36 horas da inoculação. Foram feitas marcações com caneta permanente na parte posterior das placas. Nos locais marcados foram recortadas as membranas de diálise com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril.

As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em 0,05 M de tampão fosfato, pH 7,4, durante 24 horas. Após foram lavadas por seis vezes neste mesmo tampão, e então desidratadas em uma série de passagens pelo etanol (Merck) 30, 50, 60, 70, 95 e 100%, durante 10 minutos para cada concentração, com exceção da concentração 100% onde as amostras permaneceram por 5 minutos em três passagens sucessivas (NORDBRING-HERTZ, 1983).

As amostras foram secas em ponto crítico utilizando dióxido de carbono revestido em ouro e observado em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 6360) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as etapas desde a formação das armadilhas, a adesão, apreensão, digestão, culminando na morte do nematóide foram observadas. Após 7 horas da adição das larvas já havia formação de armadilhas no fungo em análise. A observação com 12 horas, permitiu a visualização de várias redes adesivas tridimensionais e várias fibrilas (Figura 1-A) e L3 de *Haemonchus* sp presas nestas armadilhas (Figura 1-B).

Nas Figuras 1-C e 1-D pode-se observar um prolongamento no bulbo de infecção sugerindo serem utilizados para perfurar a cutícula do nematóide. Esta etapa envolve não só a pressão mecânica exercida pelo fungo (Figura 1-E) durante a penetração como também a atividade de enzimas hidrolíticas (Figuras 1-F e 2-H) que solubilizam as macromoléculas existentes na cutícula do nematóide.

Na figura 2-G e 2-H observam-se bactérias do tipo bastonetes em grande quantidade no ponto de penetração do bulbo.

À medida que o processo se desenvolveu verificou-se o aumento das redes tridimensionais bem como a apreensão do nematóide em vários pontos do corpo, ficando completamente imobilizado e tomado pelo crescimento da hifa (Figura 2 – I e J). Observou-se que após 18 horas, muitas larvas já estavam mortas, outras “exaustas”, ou seja, na incidência de luz moviam-se lentamente. Outras recém capturadas se debatiam vigorosamente, mostrando a força envolvida no processo de adesão e na apreensão das larvas.

Com 24 horas após inoculação verificou-se que a maioria da L3 apreendidas não apresentava mais movimento na incidência de luz e com 36 horas algumas já se encontravam “murchas” isto é vazias indicando absorção do conteúdo pelos fungos (Figura 2- L e M).

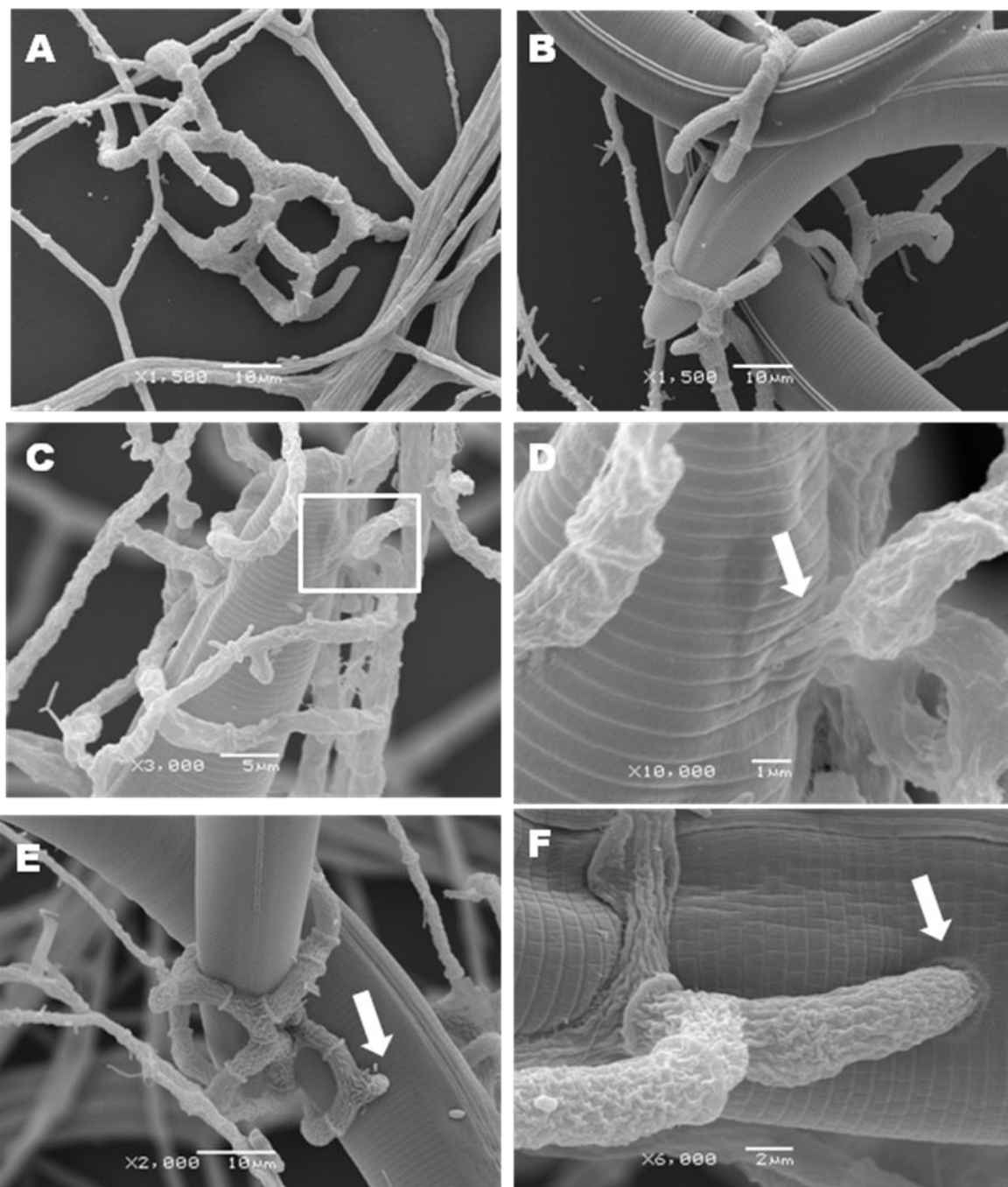


FIGURA 1: Microscopia eletrônica de varredura do processo de formação de armadilhas e interação do fungo nematófago *Artrobotrys conoides* com larvas infectantes (L3) de *Haemonchus* sp em superfície de membrana de diálise. (A) Formação de redes tridimensionais após 12 horas de inoculação das larvas de nematóides. (B) Larvas infectantes *Haemonchus* sp capturada após 12 horas de interação fungo-nematóide. (C) L3 capturada e imobilizada nas redes tridimensionais. (D) Ampliação da área em destaque da Figura (C) mostrando o prolongamento do bulbo de infecção (E) Ponto de pressão da hifa na cutícula do nematóide, a seta indica o ponto de pressão (F) Ponto de penetração da hifa (seta branca) na cutícula do nematóide.

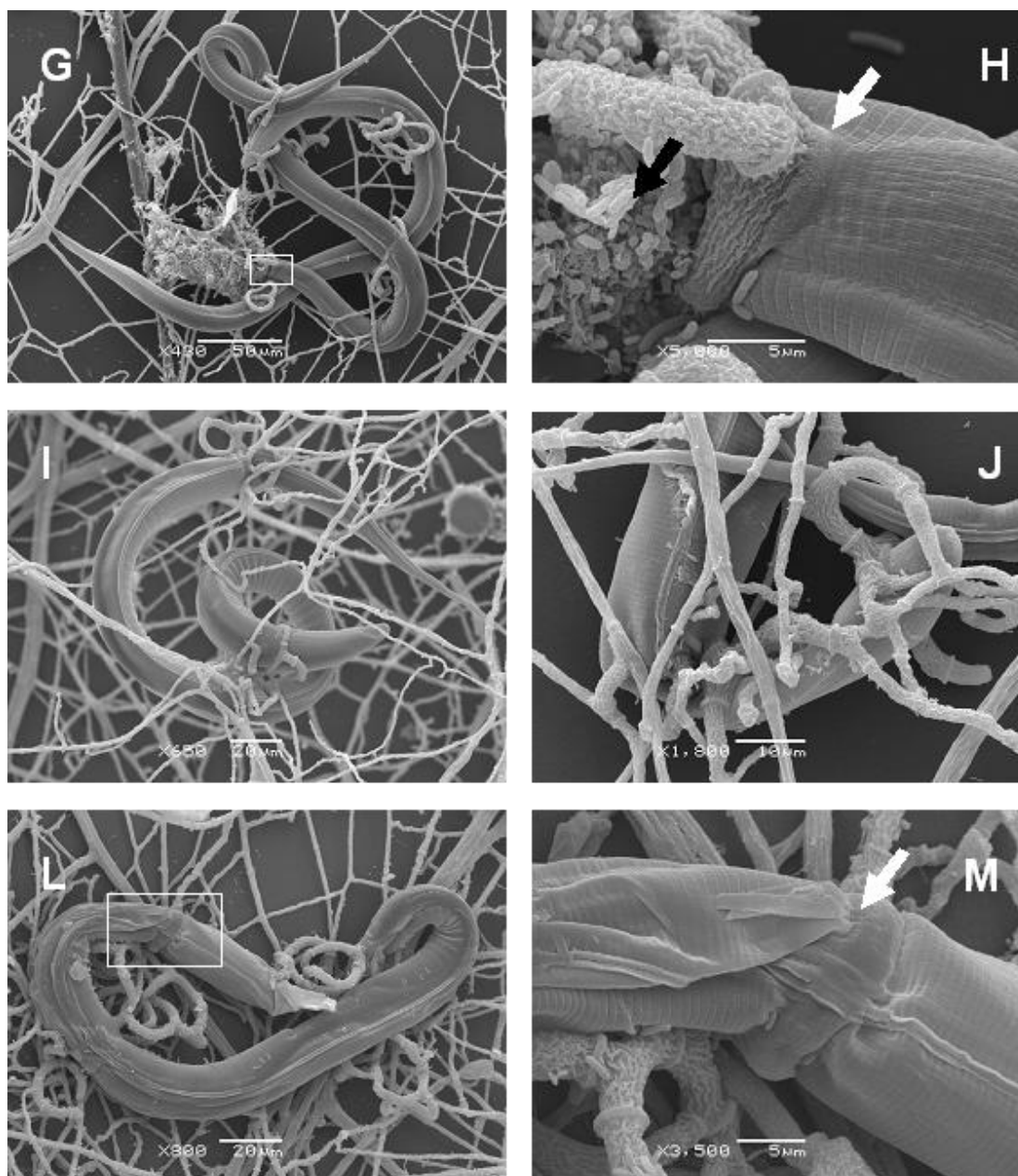


FIGURA 2: Microscopia eletrônica de varredura do processo de formação de armadilhas e interação do fungo nematófago *Arthrobotrys conoides* com larvas infectantes (L3) de *Haemonchus sp* em superfície de membrana de diálise. (G) Larvas presas as armadilhas; (H) Ampliação da área em destaque da Figura (G) mostra a presença de grande número de Nemathopagous Fungus Helper Bactéria (seta preta -H). Nota-se o ponto de penetração do fungo e o efeito da hidrólise na cutícula do nematóide (seta branca-H). (I e J) Larva presa em vários pontos do corpo nas redes tridimensionais. (L) Após 36 horas, verifica-se a diminuição do turgor da L3. (M) Ampliação da área em destaque na Figura (L) mostra a presença da hifa no corpo da larva (seta branca), sugerindo a digestão do conteúdo da larva.

A microscopia eletrônica de varredura, permitiu observar que a presença da cutícula do nematódeo induziu o rápido crescimento de hifas com formação de armadilhas tridimensionais e fibrilas. Nordbring-Hertz et al. (2006) relataram a existência de fibrilas nas redes tridimensionais do *A. oligospora*, e que após o contato com o nematóide essas fibrilas tornam-se perpendiculares à superfície do hospedeiro para facilitar a ancoragem e invasão do fungo no nematóide. Relataram ainda que a adesão do nematóide às armadilhas leva uma diferenciação do fungo, formando um tubo que perfura a cutícula do nematóide.

As imagens mostraram que após a imobilização das larvas a hifa faz uma interação fungo-larva com posterior penetração das mesmas e enfim, o processo de alimentação do fungo. Após o crescimento das hifas formam-se anéis em torno da cutícula da larva como que para prendê-las em vários pontos do corpo nas redes tridimensionais. Quando as larvas já estavam imobilizadas iniciava-se a interação entre o fungo e a cutícula do parasito. Segundo Perry e Wright (1999) a cutícula do nematódeo age como barreira para qualquer processo infectante e é indispensável que o fungo possa se ligar a ela para depois executar seu processo de penetração. Para Araújo (2001) o reconhecimento da cutícula da larva parece ser mediado pela interação lectina-carboidrato. O que se observa na sequência assemelha-se ao processo de digestão. Segundo Nordbring-Hertz et al. (2006) este processo poderia dar-se por proteases com alta homologia para subtilisina PII a qual tem demonstrado além das funções de penetração e digestão, possuírem atividade nematotóxica.

Interessante também foi encontrar a presença das bactérias Nematophagous Fungus Helper Bactéria (NFHB). Essas observações são corroboradas por outros autores que relataram a presença destas em associação com *D. flagrans* e larvas de *H. contortus*, e em *A. conoides* e *A. musiformis* (GRAMINHA et al., 2001; CAMPOS et al., 2008).

Dupponois et al. (1998) denominaram essas bactérias de *Nematophagous Helper Bactéria* (NHB) por estarem envolvidas no processos de predação, esporulação e

patogenicidade do fungo, pois provavelmente produziriam substâncias que agiriam como ponte molecular entre o fungo e o nematóide.

É fundamental estudar os processos de interação fungo e nematóide para compreendermos melhor os mecanismos de ação dos fungos nematófagos ou buscarmos substâncias com atividade nematotóxica.

## **6.4 CONCLUSÃO**

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou observar claramente todas as etapas envolvidas na atividade predatória da cepa de *Arthrobotrys conoides* contra larvas infectantes de *Haemonchus* sp.

## 6.5 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control *in vitro* of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 46, 197-204, 1994.
- ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; PAIVA, F.; VIEIRA- BRESSAN, M.C.R.. Efeito antagonista de fungos predadores do gênero *Arthrobotrys* sobre larvas infectantes de *Oesophagosthomum radiatum*, *Cooperia punctata* e *Haemonchus placei*. **Ver. Bras. Cienc. Vet.** 8, p. 81-84, 2001.
- CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P. Interactions between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: trichostrongyloidea). **J. Helminth.** 82, 337-341, 2008.
- CHANDRAWATHANI, P., JAMNAH, O., ADNAN, M., WALLER, P.J., LARSEN, M., GILLESPIE, A.T. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.** 120, 177–187, 2004.
- DUPPONOIS, R.; AMADOU, M.B.; MATTEILE, T. Effect of some rhizospher bacteria for the biocontrol of nematodes of the genus *Meloidogyne* with *Arthrobotrys oligospora*. **Fund. and Appl. Nematol.** 2, 157–163, 1998.
- EPE, C.; HOLST, C.; KOOPMANN, R.; SCHNIEDER, T.; LARSEN, M.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. **Vet. Parasitol.** 159, 86–90, 2009.
- FAEDO, M.; LARSEN, M.; THAMSBORG, S. Effect of different times of administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on the transmission of ovine parasitic nematodes on pasture-a plot study. **Vet. Parasitol.** 94, 55–65, 2000.



- FERNANDEZ, A.S.; LARSEN, M.; HENNINGSEN, E.; NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; BJORN, H.; WOLSTRUP, J. Effect of *Duddingtonia flagrans* against *Ostertagia ostertagi* in cattle grazing at different stocking rates. **Parasitol.** 119, 105–111, 1999.
- FONTENOT, M.E. ; MILLER, J.E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Vet. Parasitol.** 118, 203–213, 2003.
- GRAMINHA, E.B.N.; MAIA, A.S.; SANTOS, J.M.; CANDIDO, R.C.; SILVA, G.S.; COSTA, A.J. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domesticos. **Sem. Cienc. Agr.** 22, 11–16, 2001.
- KAHN, L. P.; NORMAN, T. M.; WALKDEN-BROWN, S. W.; CRAMPTON, A., O'CONNOR, L. J. Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperatures existing at lambing in Australia. **Vet. Parasitol.** 146, 83–89, 2007.
- LARSEN, M. Biological control of nematodes parasites in sheep. **J. An. Sci.** 84, 133-139, 2006.
- MAINGI , N.; KRECEK , R.C.; BILJON, N. VAN. Control of gastrointestinal nematodes in goats on pastures in South Africa using nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and selective anthelmintic treatments. **Vet. Parasitol.**, 138, 328-336, 2006.
- MANUELI, P.R., WALLER, P.J., FAEDO, M., MAHOMMED, F. Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. **Vet. Parasitol.** 81, 39–45, 1999.
- MENDONZA-DE-GIVES, P.; DAVIES, K.G.; CLARK, S.J.; BEHNKE, J.M. Predatory behavior of trapping fungi against of srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitol.** 119, 95–104, 1999.
- NORDBRING-HERTZ, B. Dialysis membrane technique for studying microbial interaction. **Appl. Environ. Microbiol.** 45, 399–407, 1983.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: Strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiol. Sci.** 5, 108–116, 1988.

NORDBRING-HERTZ, B., JANSSON, H.B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester. doi:10.1038/npg.els.0004293, <http://www.els.net/> pp1-11, 2006.

PENA, M.T., MILLER, J.E., FONTENOT, M.E., GILLESPIE, A., LARSEN, M.2002. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. **Vet. Parasitol.** 103, 259–265, 2002.

PERRY, R. M.; WRIGTH, D. J. The physiology and biochemistry of free living and plant parasitic nematodes. CABI Publishing, Wallingford, 1999, p. 464.

ROBERTS, F.H.S.; O’SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting tract of cattle. **Austr. J. Agr.** 1, 6-7, 1950.

SANYAL, P.K. Screening for Indian isolates of predacious fungi for use in biological control against nematode parasite of ruminants. **Vet. Res. Commun.** 24, 55–62, 2000.

VATTA, A.F., LETTY, B.A., VAN DER LINDE, M.J., VAN WIJK, E.F., HANSEN, J.W., KRECEK, R.C. Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus* spp. in goats farmed under resource poor conditions in South Africa using an eye color chart developed for sheep. **Vet. Parasitol.** 99, 1–14, 2001.

WALLER, P.J., SCHWANN, O., LJUNGSTROM, B.-L., RYDZIK, A., YEATES, G.W. Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the Island of Gotland. **Vet. Parasitol.** 126, 299–315, 2004.

## CAPÍTULO 6

### 7. EFEITO DA PULVERIZAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Arthrobotrys conoides* NA PASTAGEM PARA O CONTROLE DA VERMINOSE EM OVINOS.

#### RESUMO

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito da pulverização de conídios do fungo *Arthrobotrys conoides* sobre a pastagem visando o controle biológico da verminose gastrointestinal em cordeiros. Para tanto uma área de 12.000 m<sup>2</sup> foi dividida seis piquetes de 2.000 m<sup>2</sup>. Dois grupos de pastagem foram formados. O grupo controle constituído por três piquetes, não recebeu aplicação de conídios na pastagem. O grupo tratamento (também com três piquetes) constituiu o grupo tratado em que foram pulverizados conídios. A pastagem era constituída por aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.). As pulverizações foram realizadas semanalmente, na quantidade de  $7,5 \times 10^4$  conídios m<sup>-2</sup>. Tanto no piquete controle quanto no que recebeu tratamento foram colocados cinco cordeiros por ser o grupo mais susceptível às parasitoses. A avaliação do controle biológico foi realizada no período de maio a setembro de 2009. Os parâmetros avaliados foram contagem de larvas infectantes (L3) na pastagem; taxa de infecção de animais sentinelas monitorados pela contagem de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) e pelo número de nematóides do solo. O número de larvas de helmintos nas pastagens tratadas reduziu significativamente nos meses de Maio, Julho e Agosto, com média de redução em 52,4% no final do experimento quando comparado ao grupo controle, diferindo estatisticamente entre si. Observaram-se as maiores reduções na contagem de OPG nos meses de Julho (51,4%) e Agosto (56,4%), ficando a média geral em 49,1% quando comparado ao controle. Os gêneros de helmintos predominantes foram *Haemonchus* e *Trichostrongylus*. O ganho de peso dos animais e o número de nematóides do solo não diferiram estatisticamente.

**Palavras-chave:** Controle biológico, fungos nematófagos, Trichostrongylidae.

## EFFECT OF *Arthrobotrys conoides* SPRAY IN PASTURES FOR NEMATODE CONTROL IN SHEEP

### ABSTRACT

The present work evaluates the application – by dispersion – of conidia of the *Arthrobotrys conoides* fungus in pasture aiming the biological control of gastrointestinal nematodes in lambs. An area of 12000 m<sup>2</sup> was divided into six 2000 m<sup>2</sup> plots. Two pasture groups were formed-group control- pastures without sprayed, with 3 plots and group treatment – sprayed with *Arthrobotrys conoides*/CED conidia with 3 plots. The pasture consisted of black oats (*Avena strigosa* Schreb) and annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Sprayings were carried out weekly, using  $7.5 \times 10^4$  conidia m<sup>-2</sup>. Five lambs were introduced both in the group 1 -control plot- and in the group 2 -treatment plot- because they are the most susceptible to parasites. Evaluation of the biological control was carried out from May to September 2009, by counting the number of infective larvae (L3) in the pasture, contamination of gastrointestinal parasites in sentinel animals (counting eggs per gram of feces – OPG), and the number of soil nematodes. The numbers infective larvae reduced in the months of May, July and August, showed mean 52.4% reduction when compared to the control group, with statistic significance. Reduction in helminth count per gram of lamb feces was observed in the months of July (51.4%) and August (56.4%), with a general average of 49,1% when compared to control group. The dominant genera of helminth were *Haemonchus* and *Trichostrongylus*. The animals' weight gain and the number of soil nematodes were not statistically different.

**Key-words:** Biological controls, nematophagous fungi, Trichostrongylidae.

## 7.1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 90 vários pesquisadores vem alertando que o uso intensivo dos compostos químicos é o fator mais importante para o aparecimento da resistência parasitária em ovinos (WALLER et al., 1995). As consequências vêm sendo relatadas na literatura científica com registros de casos de resistência aos anti-helmínticos para os diferentes princípios ativos e em diferentes partes do mundo (WALLER et al., 1995; THOMAZ-SOCCOL et al., 1996; 2004; VAN WYK et al., 1999; JACKSON & COOP, 2000; KAPLAN, 2004). No Brasil não foi diferente de outras regiões do mundo, pois o surgimento de resistência dos parasitos de ovinos aos anti-helmínticos foi relatado nos três Estados da região Sul do Brasil. No Estado do Paraná, alguns rebanhos já não dispõem mais de princípio ativo eficaz (THOMAZ-SOCCOL et al., 1996, 2004). No Rio Grande do Sul a resistência à ivermectina e aos benzimidazóis atingiu 13% e 90%, respectivamente, das propriedades (ECHEVARRIA et al., 1996) e, em Santa Catarina vários princípios ativos de anti-helmínticos foram assinalados com resistência (ROSALINSKI-MORAES et al., 2007).

Isso tem gerado preocupação fazendo com que vários pesquisadores, de diversas regiões do mundo, busquem alternativas ou novos métodos de controle que reduzam a utilização de anti-helmínticos. Uma destas alternativas discutidas atualmente é o tratamento seletivo alvo (*Target Selective Treatment-TST*), que consiste em identificar somente aqueles animais que necessitam de tratamento, com base em indicadores que detectam essa necessidade, conforme a composição da espécie de parasito existente no rebanho (KENYON et al., 2009; BATH & VAN WYK, 2009). O método Famacha vem sendo usado desde o início dos anos 2000 (VAN WYK & BATH, 2002), o escore de diarreia foi proposto por Cabaret et al. (2006), a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) ou ainda índices de produção como ganho de peso também vem encontrando seus defensores (STTAFORD et al., 2009). Outras propostas de controle são a utilização de diferentes tipos de gramíneas e o

manejo das mesmas para reduzir a contaminação dos animais por larvas infectantes de nematóides (GAZDA et al., 2009).

Outra frente em que se vem trabalhando é o controle biológico, conhecido desde os anos 40 do século passado (Roubaud & Descazeaux, 1941 citado por MOTA et al., 2003). Pesquisas realizadas utilizando fungos nematófagos têm demonstrado grande potencial como agente no controle biológico contra os estágios de vida livre de nematóides gastrintestinais de ruminantes (PENA et al., 2002; FONTENOT et al., 2003; WALLER et al., 2004; LARSEN, 2006), podendo ser utilizado de forma integrada a outras medidas de controle, visando à redução da contaminação das pastagens e, conseqüentemente, da população de nematóides parasitos dos animais criados extensivamente e com grande lotação por área (WALLER & FAEDO, 1993).

Os trabalhos realizados a campo têm utilizado clamidosporos do fungo *Duddingtonia flagrans* administrados por via oral, misturados na ração. Resultados positivos, como redução de larvas infectantes na pastagem, número de parasitos em animais traçadores, foram obtidos por Fernandez et al. (1999); Faedo et al. (2000) e Fontenot et al. (2003). No entanto, outros autores não verificaram nenhuma diferença significativa nos parâmetros parasitológicos avaliados utilizando a mesma cepa de *D. flagrans* (EYSKER et al., 2006; FAESSLER et al., 2007; EPE et al., 2009). Um dos fatores que poderia contribuir para resultados negativos é a distribuição dos esporos de forma não homogênea na pastagem (WALLER et al., 2001; PENA et al., 2002). Ao utilizar a administração de esporos pela via oral, misturados á ração, se torna muitas vezes difícil de confirmar se realmente todos os animais ingeriram a mesma quantidade de esporos, dificultando essa distribuição homogênea na pastagem (EPE et al., 2009).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto ambiental e o controle das nematodioses de ovinos utilizando a pulverização de conídios de *Arthrobotrys conoides* em

pastagem constituída por aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.).

## 7.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Cepas do Fungo *Arthrobotrys conoides*

A cepa utilizada *Arthrobotrys conoides* foi isolada na região Centro Sul do Estado do Paraná. A análise da sequência da região ITS do gene rDNA do isolado mostrou uma identificada de 97% com a cepa 670 de *A. conoides* pelo algoritmo BLAST (FALBO et al., 2010). Optou-se trabalhar com o isolado da região por sua melhor adaptabilidade às condições climáticas locais. O isolado obtido de *A. conoides*, apresentou eficiência de 96,35% de redução sobre diferentes espécies de nematóides constituído de um *pool* na proporção 64% *Haemonchus* sp; 22% *Trichostrongylus* sp, 14% de *Strongyloides papillosus* (FALBO et al., 2010).

### 7.2.2 Produção de Conídios para o Teste de Campo

Discos de 4 mm de diâmetro contendo material fúngico do isolado *A. conoides* mantido em Corn Meal Agar (CMA)[Difco® - 17 g L<sup>-1</sup>], a 4 °C, em ausência luz, foram inoculados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, utilizando como meio de cultura o Batata Agar Dextrose (BDA) [Himédia®- 39 g L<sup>-1</sup>], as placas foram incubadas em BOD (Splabor®) 26 °C por seis dias. Posteriormente, fragmentos de cultura de 4 mm foram transferidos para 35 placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 15 mL de Agar a 1,5% com 5% de Farelo de trigo, as quais foram incubadas a 26 °C em ausência luz por 10 dias. Após este período, as superfícies das placas foram lavadas para extração dos conídios (com auxílio de um pincel esterilizado) com 8 mL água destilada com uma gota de Tween 80 (previamente esterilizado)

[ARAÚJO et al., 1993]. A solução obtida foi acondicionada em Erlenmeyers de 500 mL esterilizados e homogeneizada em um agitador magnético durante 40 minutos. Em seguida foi filtrada em peneira com gaze dobrada duas vezes para retirar o excesso de micélios com o intuito de não obstruir o bico do pulverizador na fase de aplicação nas pastagens (ver item 8.2.3). A quantidade de conídios foi determinada em câmara de Neubauer, utilizando os dois lados da câmara, e em triplicata conforme descrito por Nielsen et al. (1991).

### *7.2.3 Local do Experimento*

Este trabalho foi conduzido na Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, localizado na região Centro-Sul do estado, na cidade de Guarapuava, que se caracteriza por apresentar clima subtropical mesotérmico úmido, sem estação seca, com verões frescos e inverno moderado conforme a classificação de Köppen. A temperatura média no mês mais frio é inferior a 18 °C, e a temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C. A precipitação anual varia de 1.400 a 2.000 mm, sendo os meses de Abril, Maio e Agosto os de menores precipitações. A altitude é de aproximadamente 1100 m (MAACK, 1968).

Em uma área de 12.000 m<sup>2</sup> foram formados seis piquetes com 2.000 m<sup>2</sup> cada, em uma área de integração lavoura-pecuária, onde no verão é cultivado milho ou feijão e no inverno é formado pastagem para produção de ovinos. Portanto, essa área foi pastejada por ovinos no inverno do ano anterior, ou seja, de 15 de Junho a 15 de Novembro de 2008. A implantação da pastagem de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) ocorreu em Abril/2009 e os animais foram introduzidos nos piquetes no dia 16 Maio permanecendo até Setembro de 2009.



#### 7.2.4 Animais

Vinte e quatro ovelhas com cordeiros ao pé, totalizando 48 animais mestiços Ile de France x Corriedalle, foram divididos, com base no peso corpóreo, em seis piquetes com 2.000 m<sup>2</sup> cada, com quatro animais adultos mais quatro cordeiros recém nascidos, os quais permaneceram com suas mães no período de 16 de Maio a 09 de Junho de 2009. Durante o experimento ocorreu uma geada no dia 3 de Junho afetando a pastagem, sendo necessária a retirada dos animais dos piquetes no dia 09 de Junho, por um período de 21 dias para que houvesse a recuperação da pastagem. Mesmo na ausência dos animais foi mantida a pulverização semanal dos conídios nos piquetes, bem como a colheita de pastagem para extração de larvas infectantes (L3). Os animais retornaram no dia 29 de Junho, data em que foram desmamados e vermifugados (Cydectin®.- moxidectina, na dose de 0,2 mg Kg<sup>-1</sup>) retornando para os piquetes somente os cordeiros.

Nesta etapa manteve-se cinco cordeiros desmamados por piquete, com base no peso corpóreo (940 Kg ha<sup>-1</sup>), totalizando três repetições cada, sendo o Grupo controle os piquetes controle, onde não era pulverizado conídios na pastagem, e o Grupo tratamento consistia naqueles piquetes sobre os quais eram aspergidos os conídios na pastagem com auxílio de um pulverizador manual, semanalmente na dose 7,5 x 10<sup>4</sup> conídios m<sup>-2</sup>. A aplicação ocorreu sempre a tarde no período de menor intensidade de vento, e, em dias chuvosos a pulverização era transferida para o dia seguinte.

#### 7.2.5 Contagem de Ovos de Helminthos por Grama de Fezes (OPG), FAMACHA® e Ganho Médio de Peso

Quinzenalmente amostras de fezes dos animais foram colhidas diretamente da ampola retal e processadas utilizando a técnica de McMaster modificada para determinar o número de ovos de helmintos por grama de fezes- OPG (GORDON & WHITLOCK, 1939; COLES et al.,

1992). A coprocultura foi realizada de acordo com Roberts & O'Sullivan (1950), e a identificação das larvas de acordo com os critérios estabelecidos por Keith (1953) e Van Wyk et al. (2004). A pesagem dos animais também foi realizada no início do experimento e a cada 15 dias. A aplicação do método FAMACHA® (VAN WYK & BATH, 2002) foi realizada em todos os animais a partir de Agosto a cada 15 dias até o final de Outubro.

#### *7.2.6 Colheita de Pastagem para Recuperação e Contagem de Larvas Infectantes de Trichostrongilídeos por Quilo de Matéria Seca*

Antes da entrada dos animais nos piquetes e a cada 15 dias foram coletadas amostras de pastagem para extração das larvas infectantes (L3) de nematóides gastrintestinais em todos os piquetes, sempre realizadas no horário no horário entre 07h30min e 10h00min da manhã. Em cada piquete foram coletados oito amostras obtidas pelo lançamento ao acaso de um quadrado de 0,50 x 0,50 cm (0,25 m<sup>2</sup>) e toda a pastagem dentro desta área foram cortadas rente ao solo com um estilete, acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao laboratório para seu processamento. Se o quadrado caísse em um local onde havia muitas fezes era lançado novamente. Essas amostras foram misturadas, pesadas, desse total foram retirados 200 gramas e acondicionados em sacos de papel e colocados em estufa a 72 °C por 3 dias para obtenção da matéria seca e a massa de forragem da área expressa em Kg MS. há<sup>-1</sup>. Quinhentos gramas de pastagem foram utilizados para extração das larvas infectantes de acordo com o método de Baermann modificada por Persson (1974). Para remoção de partículas mais finas do solo foram utilizados lenços Kleenex® sobre a tela que mantinha suspensa a amostra de pastagem (LARSSON et al., 2007). As amostras foram processadas sendo o volume igualado para 10 mL. No momento da leitura os tubos foram homogeneizados e três alíquotas de 100 µL cada foram retirados para quantificação e identificação de larvas infectantes de trichostrongilídeos (FONTENOT et al., 2003).

### *7.2.7 Coleta de Amostras de Solo*

Para avaliar o impacto ambiental que a aplicação dos conídios poderia ocasionar foram realizadas coletas de solo mensalmente na profundidade de 0-5 cm, com trado calador, para extração, quantificação e classificação dos nematóides de vida livre e fitonematóides dos piquetes. Em cada piquete foram retiradas 10 amostras de solo.

### *7.2.8 Extração, Quantificação e Classificação dos Nematóides do Solo*

As 10 amostras de solo de cada piquete foram misturadas e 100 gramas de solo foram utilizadas para extração de nematóides pelo método de funil de Baermann modificado (HOPPER, 1986) durante 48 horas, com três repetições para cada amostra. O volume da solução obtida foi igualado a 1 mL, homogeneizado e três alíquotas de 100 µL cada foram colocadas sobre uma lâmina para quantificar e classificar os nematóides de vida livre e fitonematóides de acordo com Bongers (1988).

### *7.2.9 Índices Climáticos*

Diariamente nesse período foram registrados os índices pluviométricos bem como variação de temperatura no ambiente e no solo, na estação Meteorológica da Universidade Estadual do Centro Oeste localizada a 200 metros da unidade experimental. Os dados pluviométricos foram utilizados para realização do balanço hídrico climatológico empregando-se o programa “BHnorm” elaborado em planilha EXCEL por Rolim et al. (1998).

### 7.2.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos á análise da variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa de análise estatística SAS.

## 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de realização deste experimento, a precipitação ficou dentro da normalidade para região quando comparado com os últimos 10 anos. Como mostra a Figura 1 verificou-se que não houve deficiência hídrica. A temperatura mínima registrada foi de  $-4^{\circ}\text{C}$  e a máxima de  $28,2^{\circ}\text{C}$ , ficando a média mínima em  $9,6^{\circ}\text{C}$  e máxima de  $19,8^{\circ}\text{C}$  (Figura 2). Nos meses de Junho e Julho observaram-se as médias mais baixas, ficando os outros meses (Maio, Agosto e Setembro) com médias que variaram de  $15,4$  a  $17^{\circ}\text{C}$ .

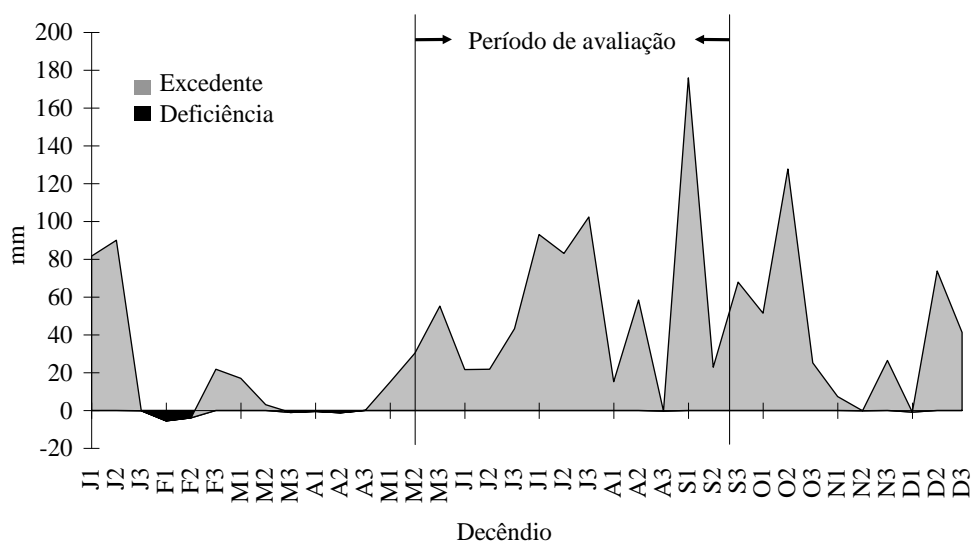


FIGURA 1: Representação gráfica do balanço hídrico sequencial de cada intervalo de 10 dias, durante o ano de 2009 em Guarapuava, PR.

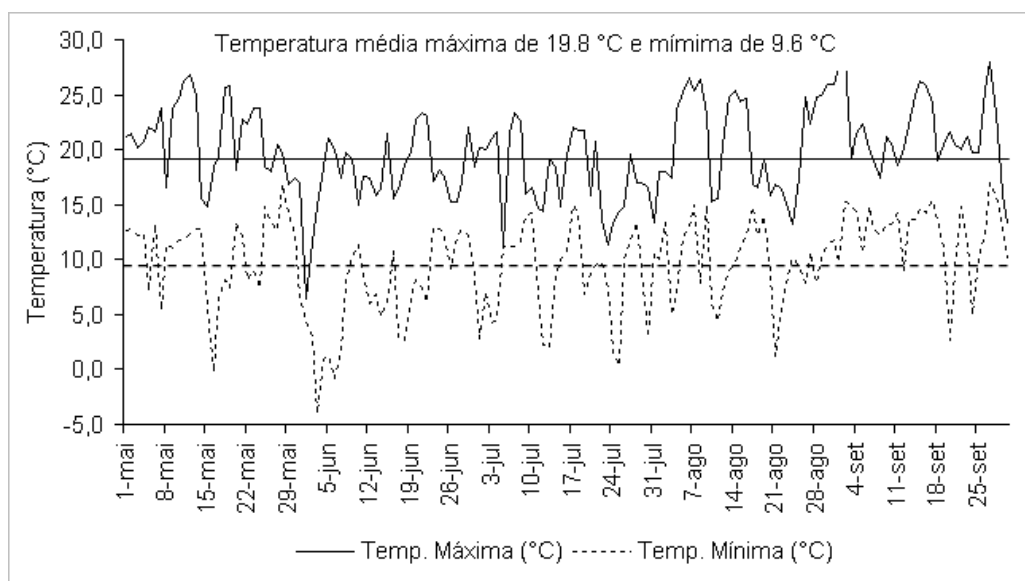


FIGURA 2: Representação gráfica da temperatura máxima e mínima durante o período do experimento, de Maio a Setembro de 2009, em Guarapuava-PR.

A temperatura ideal de crescimento para fungos nematófagos está entre 15 °C e 30 °C (PANDEY, 1973). Embora a temperatura média durante a realização do experimento tenha ficado no limite mínimo ideal para crescimento do fungo, observou-se uma alta densidade de L3 na pastagem o que poderia estimular sua atividade, pois segundo Fontenot et al. (2003) a variação na atividade dos fungos nematófagos tanto na coprocultura como na pastagem pode estar associada a temperatura e a densidade larval. Por outro lado, a temperatura ideal para crescimento do fungo é também a ideal para o desenvolvimento dos estágios larvais de nematóides parasitos de ruminantes, por este aspecto pode-se esperar um desenvolvimento propício de ambos em um mesmo tempo.

Desta forma, ao analisarmos a Figura 3 verificou-se que houve pouco desenvolvimento de L3 após queda de temperatura verificada na primeira quinzena de Junho, o que refletiu na avaliação subsequente de L3 na pastagem, como também é possível verificar o inverso, o aumento da temperatura proporcionou melhor desenvolvimento de L3 e provavelmente melhor desenvolvimento e eficácia do fungo. Ao compararmos o grupo controle (controle)

com o grupo tratamento (pastagem com pulverização de conídios) verificou-se um menor número de L3 principalmente nos 45 dias finais de avaliação como também na contagem de ovos por grama de fezes.

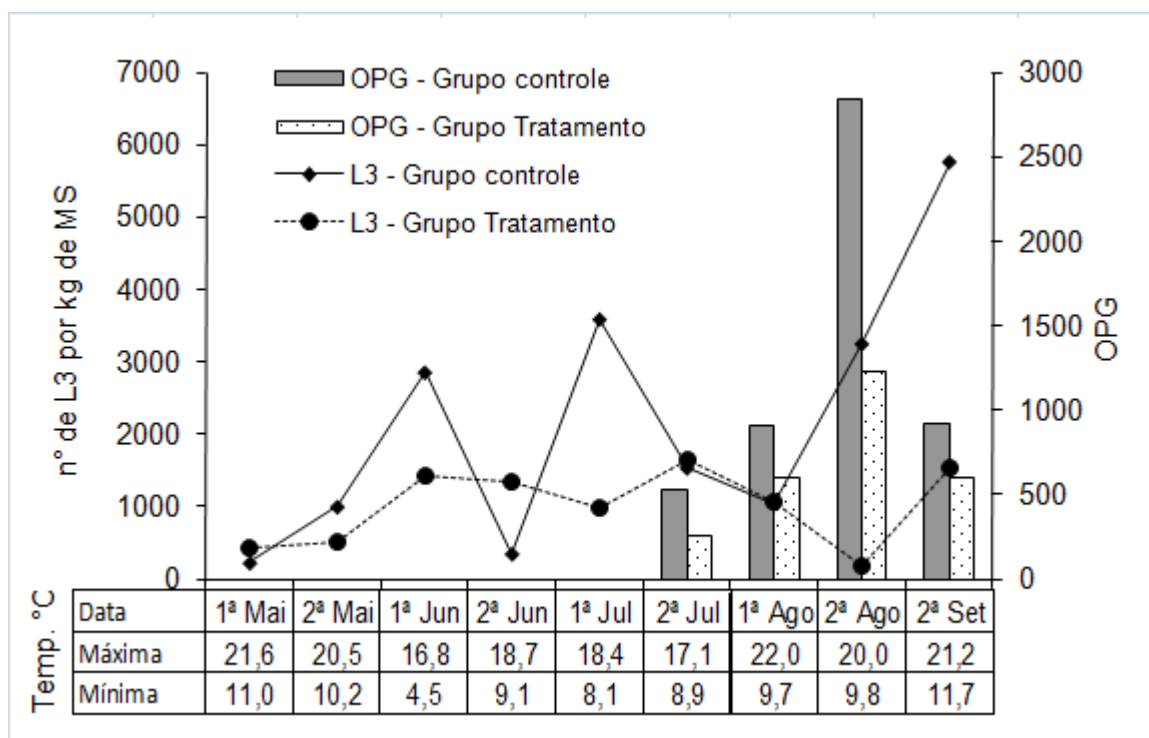


FIGURA 3: Número de larvas infectantes de tricostrongilídeos na pastagem (L3), número de ovos por grama de fezes e variação temperatura ao longo do experimento.

Kahn et al. (2007) simularam variações de temperatura ambiental com o objetivo de verificar qual a melhor faixa de temperatura no desenvolvimento e eficácia do fungo *D. flagrans* contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e obtiveram redução de 89% quando a temperatura que variou entre 6 °C -19 °C e de 99,1% em temperatura de 9 °C - 25 °C, sugerindo que mesmo em temperaturas mais baixas há desenvolvimento e atividade predatória do fungo.

Antes da entrada dos animais, foi observado média de 329 larvas (L3)  $\text{Kg}^{-1}$  Matéria Seca (MS). Durante todo período do experimento a contagem de L3 na pastagem variou de 228 a 5752 larvas  $\text{Kg}^{-1}$  M.S. A média geral foi mais alta nos piquetes controle (2035 L3  $\text{Kg}^{-1}$  MS) quando comparado com os piquetes tratados (969 L3  $\text{Kg}^{-1}$  MS), diferindo estatisticamente entre si, obtendo-se redução de 52,4% (Tabela 1).

A avaliação da contagem de ovos de helmintos por grama de fezes mostrou que nos meses de Julho e Agosto houve redução significativa, de 51,4% e 56,4%, respectivamente, em relação ao grupo controle, e a média geral de redução do OPG foi de 49,1% nos animais dos piquetes em que na pastagem eram pulverizados os conídios (Tabela 2). Nenhum dos animais, de ambos os grupos, necessitou ser vermifugado durante todo o período avaliado, apesar da contagem alta de OPG no dia 24 de agosto, decidiu-se pelo não tratamento, com base no método FAMACHA<sup>®</sup> (Tabela 3) e em outros sinais clínicos de verminose como diarreia e, ou perda de peso.

Eysker et al. (2006) e Epe et al. (2009), em estudos realizados na Holanda e na Alemanha respectivamente, não verificaram redução na contagem de OPG, do número de L3 na pastagem e da carga parasitária nos animais traçadores, atribuindo esses resultados as condições climáticas (alto índice pluviométrico) e a forma de administração dos clamidosporos, por via oral, adicionado a ração, pois segundo esses autores é difícil confirmar a quantidade de conídios ingeridos por animal interferindo numa distribuição homogênea na pastagem.

TABELA 1: Número total de larvas infectantes (L3) de nematódeos gastrintestinais de ovinos presentes na pastagem por Kg de Matéria Seca (M.S) do grupo controle (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo tratamento (pastagem com pulverização de conídios do *A. conoides*) durante o período de maio a setembro de 2009, em Guarapuava-PR.

Grupos	Larvas L3 por kg de MS										Média
	15-mai	30-mai	14-jun	29-jun	14-jul	29-jul	13-ago	28-ago	12-set	27-set	
Grupo controle	228	1000	2852	351	3584	1535	1042	3246 a	758	5752 a	2035 b
Grupo tratamento	430	510	1436	1355	985	1658	1067	187 b	539	1526 b	969 <sup>1</sup> a
CV (%)	52,46										

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.

<sup>1</sup> redução de 52,4% em relação ao controle



TABELA 2: Contagem de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo controle (animais em pastagem sem pulverização de conídios) e grupo tratamento (animais em pastagem com pulverização de conídios do *A. conoides* e percentagem de redução do grupo tratamento em relação ao grupo controle.

Data	OPG		Redução
	Grupo controle	Grupo tratamento	(%)
29-jul	531 b A	258 a A	51,4
12-ago	905 b A	600 a A	33,7
24-ago	2840 a A	1228 a A	56,7
21-set	921 ab A	596 a A	35,3
Média	1355 A	689 A	49,1
C.V (%)	22.0		

Letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.

A utilização do método FAMACHA<sup>®</sup> permitiu observar que no período experimental o grupo de animais alocados nos piquetes sem pulverização de conídios apresentou famacha em valores crescentes ao longo do tempo, diferente daqueles animais que estavam nos piquetes com pulverização que apresentou valores constantes nos últimos meses de avaliação, diferindo estatisticamente do outro grupo (Tabela 3).

Se analisarmos conjuntamente os resultados de larvas infectantes por Kg MS<sup>-1</sup> (Tabela 1) e redução no OPG (Tabela 2) e Famacha (Tabela 3) verifica-se que os melhores índices de redução encontram-se no período final do experimento, permitindo inferir que o controle biológico utilizado por um tempo mais prolongado apresentaria melhores resultados.

TABELA 3: Média das avaliações pelo método Famacha<sup>®</sup> realizados nos animais pertencentes ao Grupo controle (pastagem sem pulverização de conídios) e Grupo tratamento (pastagem com pulverização de conídios *A. conoides* no período de Agosto a outubro de 2009).

Tratamento	Data da Avaliação (Famacha 1 a 5)					
	10/ago	24/ago	7/set	21/set	5/out	23/out
Grupo controle	1,11 ns	1,50 ns	1,83 ns	1,89 ns	2,28 a	2,44 a
Grupo tratamento	1,33	1,50	1,56	1,78	1,78 b	1,78 b
Média	1,22	1,50	1,69	1,83	2,03	2,11
C.V. (%)	11,0	20,7	20,1	3,7	5,8	9,6

ns = não significativo. Médias seguidas por letras distintas, na vertical, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

Neste experimento utilizou-se a estratégia de realizar a pulverização direta de conídios na pastagem e observaram-se duas vantagens quando comparada com a administração oral. A primeira, pela quantidade e distribuição mais homogênea de esporos, enquanto que pela via oral se torna difícil de ser mensurada a quantidade real excretada de conídios com as fezes, a pulverização possibilitaria determinar a quantidade ideal de conídios para cada propriedade baseado em estudos epidemiológicos para cada região, uma vez que estudos realizados por Ojeda-Robertos et al. (2008a) sugeriram estipular a dose conforme o número de OPG, numa proporção de 5 clamidosporos por grama de fezes (CPG) para cada 10 OPG. Ou, talvez, a dose de aplicação na pastagem poderia estar associada ao seu grau de infectividade.

Neste trabalho foi utilizado  $7,5 \times 10^4$  conídios  $m^{-2}$  pulverizado semanalmente. Considerando que a dose oral administrada na maioria dos trabalhos seja de  $10^6$  Kg<sup>-1</sup> de peso vivo e a disgestibilidade dos clamidosporos seja ao redor de 88 a 90% (Gronvold et al. 2004; Ojeda-Robertos et al. 2008b) a quantidade de conídios pulverizada foi semelhante a utilizada na administração oral.

Outro ponto a ser considerado é que a pulverização possibilitaria que o animal ingerisse conídios durante o pastejo e, portanto eliminaria juntamente com as fezes auxiliando na manutenção dos conídios no ambiente.

Muitos trabalhos têm sido realizados com administração de cepa *D. flagrans* adicionados na ração, e os autores relataram a diferença na eficácia do fungo quando compararam bovinos com ovinos, atribuindo essa diferença na estrutura das fezes nestas duas espécies, o que poderia influenciar no desenvolvimento e, ou, atividade do fungo (FAESSLER et al. 2007). Em virtude disto, especialmente no caso de pequenos ruminantes, criados extensivamente e sem suplementação, a pulverização na pastagem poderia ser mais viável do que a administração por via oral.

A análise de ganho médio de peso dos animais mostrou que não houve diferença significativa durante todo período avaliado (Tabela 4), fato esse também verificado por Epe et al. (2009).

O gênero de parasito predominante nas coproculturas dos animais durante todo período do experimento foi *Haemonchus* (91%) seguido pelo gênero *Trichostrongylus* (9%). Porém, no período de 24 de agosto e 21 de setembro, verificou-se uma diminuição nesta percentagem para o gênero *Haemonchus* (62%) e um aumento na percentagem para o gênero *Trichostrongylus* (38%).

Quanto ao impacto ambiental que talvez pudesse ser ocasionado devido a administração de conídios no solo, verificou-se que não houve diferença significativa no número de fitonematóides (Tabela 5) e de nematóides de vida livre (Tabela 6) do solo entre os dois grupos.

TABELA 4: Peso vivo inicial, final e ganho médio diário (GMD), dos animais pertencentes ao grupo controle (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo tratado (pastagem com pulverização de conídios do *A. conoides*).

Tratamento	Peso Vivo (kg)		GMD (kg animal dia)
	Inicial	Final	
Grupo controle	17,0	37,1	0,161
Grupo tratamento	16,3	36,2	0,159
Média	16,6	36,6	0,160
C.V. (%)	17,8	15,0	16,8

TABELA 5: Número de fitonematóides por metro quadrado de solo dos piquetes do grupo controle (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo tratamento (pastagem com pulverização de conídios do *A. conoides*) durante o período de maio a outubro de 2009, em Guarapuava-PR.

Tratamento	Fitonematóides (nº por metro quadrado de solo x 10 <sup>4</sup> )						Média
	25/5/2009	26/6/2009	29/7/2009	26/8/2009	25/9/2009	28/10/2009	
Grupo controle	5,9	7,3	7,4	4,6	11,5	8,2	7,5
Grupo tratamento	7,9	8,4	10,6	5,1	5,4	11,5	8,2
CV (%)	29,23						

TABELA 6: Número de nematóides de vida livre por metro quadrado de solo dos piquetes do grupo controle (pastagem sem pulverização de conídios) e grupo tratamento (pastagem com pulverização de conídios do *A. conoides*) durante o período de maio a outubro de 2009, em Guarapuava-PR.

Tratamento	Nematóides de vida livre (nº por metro quadrado de solo x 10 <sup>4</sup> )						Média
	25/5/2009	26/6/2009	29/7/2009	26/8/2009	25/9/2009	28/10/2009	
Grupo controle	21,4	60,7	51,0	65,8	60,9	24,8	47,4
Grupo tratamento	24,1	68,9	65,9	83,4	43,1	37,8	53,9
CV (%)	15,79						

Yeates et al. (2007), em estudo realizado em parcelas com fezes de ovinos que receberam diferentes tratamentos utilizados no controle da verminose verificaram que a decomposição das fezes dos animais tratados com albendazol e ivermectina foram mais lento do que daqueles que receberam o fungo *D. flagrans*, sugerindo diminuição na atividade dos nematóides. Relataram também não haver evidências de que *D. flagrans* persista no campo e que provoque algum tipo de impacto ambiental, pois as análises mostraram um aumento relativo na proporção de nematóides nas parcelas tratadas com fezes de animais que ingeriram confídios.

Faedo et al. (2002) também relataram ser improvável que a utilização de *D. flagrans* tenha um efeito negativo sobre os nematóides benéficos do solo, porém, observaram que não houve impacto na predação sobre a população de nematóides, pois não verificaram redução na quantidade desses nematóides, sugerindo que o fungo tinha um crescimento mínimo em torno do ambiente fecal. Ainda, segundo Faedo et al. (2002) um indicador útil seria avaliação da atividade predatória no solo, mas infelizmente ainda não há uma técnica adequada disponível.

O propósito de um novo método de controle das helmintoses seria manter um nível de infecção baixo de forma que neutralize o impacto econômico negativo que essas infecções acarretam no rebanho (KETZIS et al., 2006). E de certa forma permitiria aos animais desenvolverem anticorpos contra os parasitos. Assim, os resultados encontrados neste trabalho são promissores.

## 7.4 CONCLUSÕES

O fungo *A. conoides* quando pulverizado esporos na pastagem mostrou ser uma alternativa de administração fácil e eficiente, promoveu a redução em 52,4% das L3 na pastagem refletindo redução média de 49,1% no número de OPG.

Não houve evidências de que o fungo *A. conoides* aplicado sobre a pastagem tenha provocado alguma ação predatória sobre nematóides de vida livre e fitonematóides.

## 7.5 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. **J.Helminthol.** 67, 136-138, 1993.
- BATH, G. F.; VAN WYK, J.A. The five Points Check for target selective treatment of internal parasites in small ruminants. **Small Rumin. Res.** 86, 6-13, 2009.
- BONGERS, T. (Ed.), 1988. **De Nematoden van Nederland**. Pirola, Schoorl, Netherlands, 408 págs.
- CABARET J.; GONNORD V.; CORTET J.; SAUVÉ C.; BALLEST J.; TOURNADRE H.; BENOIT M. 2006. **Indicators for internal parasitic infections in organic flocks: the diarrhea score (Disco) proposal for lambs**. Organic Congress 2006: Organic Farming and European Rural Development. Odense DK 30-31 May 2006, 552-553.
- COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H.M., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M.A., WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Vet. Parasitol.** 44, 35–44, 1992.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematodes parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Vet. Parasitol.** 62, 199-206, 1996.
- EPE, C.; HOLST, C.; KOOPMANN, R.; SCHNIEDER, T.; LARSEN, M.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. **Vet. Parasitol.** 159, 86–90, 2009.
- EYSKER, M.; BAKKER, N.; VAN DER HALL, Y.A.; VAN HECKE, I.; KOOYMAN, F.N.; VAN DER LINDEN, D.; SCHRAMA, C.; PLOEGER, H.W. The impact of daily *Duddingtonia flagrans* application to lactating ewes on gastrointestinal nematode infections in their lambs in the Netherlands. **Vet. Parasitol.** 141, 91–100, 2006.



FAEDO, M.; LARSEN, M.; THAMSBORG, S. Effect of different times of administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on the transmission of ovine parasitic nematodes on pasture-a plot study. **Vet. Parasitol.** 94, 55–65, 2000.

FAEDO M.; LARSEN, M.; S. DIMANDER, O. G.; YEATES, W.; HO'GLUND, J.; WALLER, P. J. Growth of the Fungus *Duddingtonia flagrans* in Soil Surrounding Feces Deposited by Cattle or Sheep Fed the Fungus to Control Nematode Parasites. **Biol. Control** 23, 64–70, 2002.

FAESSLER H.; TORGERSON, P. R.; HERTZBERG, H. Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. **Vet. Parasitol.** 147, 96–102, 2007.

FERNANDEZ, A.S.; LARSEN, M.; HENNINGSSEN, E.; NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; BJORN, H.; WOLSTRUP, J. Effect of *Duddingtonia flagrans* against *Ostertagia ostertagi* in cattle grazing at different stocking rates. **Parasitol.** 119, 105–111, 1999.

FONTENOT, M.E.; MILLER, J.E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Vet. Parasitol.** 118, 203–213, 2003.

GAZDA, T.; PIAZZETTA, R.; DITTRICH, J.; MONTEIRO, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Distribution of nematode larvae of sheep in tropical pasture plants. **Small Rum. Res.** 82, 94-98, 2009.

GORDON, H. MCL.; WHITLOCK, H. N. A new technique for counting nematode egg in sheep faeces. **J. Common. Sci. Indust. Org.** 12, 50-52, 1939.

HOPPER, D.J. Extraction of free-living stages from soil. In: Southey, J.F. (Ed.), **Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes**. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Reference Book. HMSO, London, pp. 5–31, 1986.

- JACKSON, F.; COOP, R.L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitol.** 120, S95-S107, 2000.
- KAHN, L.P; NORMAN, T. M.; WALKDEN-BROWN, S.W.; CRAMPTON, A.; O'CONNOR, L. J. Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperatures existing at lambing in Australia. **Vet. Parasitol.** 146, 83-89, 2007.
- KAPLAN, R.M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends Parasitol.** 20, 477-48, 2004.
- KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Austral. J. Zool.** 1, 223-235, 1953.
- KENYON, F.; GREER, A.W.; COLES, G.C.; CRINGOLI, G.; PAPADOPOULOS, E.; CABARET, J.; BERRAG, B.; VARADY, M.; VAN WYK, J.A.; THOMAS, E.; VERCRUYSSSE, J.; JACKSON, F. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Vet. Parasitol.** 164, 12-20, 2009.
- LARSEN, M. Biological control of nematodes parasites in sheep. **J. An. Sci.** 84, 133-139, 2006.
- LARSSON, A.; DIMANDER, S.-O; RYDZIK, A.; UGGLA, A.; WALLER, P.J.; HO"GLUND, J. A 3-year field evaluation of pasture rotation and supplementary feeding to control parasite infection in first-season grazing cattle—Dynamics of pasture infectivity. **Vet. Parasitol.** 145, 129–137, 2007.
- MAAK, R. **Geografia física do Estado do Paraná.** Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Estado do Paraná, 1968, 350p.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesq. Vet. Bra.,** 23, 93-100, 2003.

- NIELSEN, L.K.; SMYTH, G.K.; GREENFIELD, P.F. Hemacytometer cell count distributions: implications of non-Poisson behavior. **Biotechnol. Prog.** 7, 560-563, 1991,
- OJEDA-ROBERTOS, N. F.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; AYALA-BURGOS, A.; COB-GALERA, L. A.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; BARRIENTOS-MEDINA, R. C.; MENDOZA DE GIVES, P. Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. **Vet. Parasitol.** 158, 329-335, 2008a
- OJEDA-ROBERTOS, N.F.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; AYALA-BURGOS, A.; AGUILAR- CABALLEROS, A.J.; COB-GALERA, L.A.; MENDOZA-DE-GIVES, P. A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in sheep faeces. **Vet. Parasitol.** 152, 339–343, 2008b.
- PANDEY, V.S. Predatory activity of nematode-trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagia* possible method of biological control. **J. Helminthol.** 48, 35–48, 1973.
- PENA, M.T.; MILLER, J.E.; FONTENOT, M.E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. **Vet. Parasitol.** 103, 259–265, 2002.
- PERSSON, L. A modified Baermann apparatus for the recovery of infective nematode larvae from herbage and manure. **Zentralbl. Veterinarmed. B.** 21, 483–488, 1974.
- ROBERTS, F.H.S.; O’SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting tract of cattle. **Aust. J. Agric.** 1, 6-7, 1950.
- ROLIM, G.S.; SENTELHAS, P.C.; BARBIERI, V. Planilhas no ambiente EXCEL para os cálculos de balanços hídricos: normal, seqüencial, de cultura e de produtividade real e potencial. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, Santa Maria, 6,133-137, 1998.

- ROSALINSKI-MORAES, F.; MORETTO, L.M.; BRESOLIN, W.S.; GABRIELLI, I.; KAFER, L.; ZANCHET, I.K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do Alto Irani (Amai), oeste de Santa Catarina. **Ciênc. Anim. Bras.** 8, 559-565, 2007.
- STAFFORD, K.A.; MORGAN, E.R.; COLES, G.C. Weight-based targeted selective treatment of gastrointestinal nematodes in a commercial sheep flock. **Vet. Parasitol.** 164, 59-65, 2009.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Vet. Rec.** 139, 421-422, 1996.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F.P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E.A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G.. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Braz. Arch. Biol. Technol.** 47, 41-47, 2004.
- VAN WYK, J.A.; STENSON, M.O.; VAN DER MERWE, J.S.; VORSTER, R.J.; VILJOEN, P.G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 66, 273–284, 1999.
- VAN WYK, J.A.; BATH, G.F. The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Vet. Res.** 33, 509-529, 2002.
- VAN WYK, J.A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Vet. Parasitol.** 119, 277-306, 2004.

WALLER, P.J.; DASH, K.M.; BARGER, I.A.; LE JAMBRE, L.F.; PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. **Vet. Rec.**, 136:411-413, 1995.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Screening studies. **Vet. Parasitol.** 49, 285–297, 1993.

WALLER, P.J.; FAEDO, M.; ELLIS, K. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. **Vet. Parasitol.** 102, 299–308, 2001.

WALLER, P.J.; SCHWANN, O.; LJUNGSTRO, M. B. L.; RYDZIK, A., YEATES, G.W. Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the Island of Gotland. **Vet. Parasitol.** 126, 299–315, 2004.

YEATES, G.W. ; SKIPP, R.A.; GRAY, R.A.J.; CHEN L.-Y.; WAGHORN, T.S. Impact on soil fauna of sheep faeces containing a range of parasite control agents. **Appl. Soil Ecol.** 35, 380–389, 2007.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram-se promissores estimulando a realização de outros estudos como: a caracterização da fisiologia desta cepa, testes com outros resíduos agroindustriais, a influência dos fatores físicos e químicos envolvidos, buscando otimizar a produção de esporos pela Fermentação em Estado Sólido (FES), bem como deverão ser estudados métodos de inoculação, velocidade de crescimento, viabilidade destes esporos após secagem, métodos de conservação.

Seria interessante também realizar o estudo das enzimas e substâncias envolvidas nos processos de adesão e penetração do fungo no nematóide.

Já está em andamento um novo teste a campo, na mesma área de integração lavoura-pecuária em que foi realizado este trabalho com o objetivo não só de consolidação das informações obtidas como também do impacto que poderia provocar no meio ambiente e no controle da verminose em ovinos quando aplicado pulverizado numa mesma área a médio e longo prazo. Deve-se também testar sua aplicação em outras épocas do ano para avaliar o efeito da temperatura na atividade predatória do fungo no controle das larvas infectantes.

Testes em parcelas com diferentes números de larvas infectantes na pastagem com concentrações de conídios diretamente proporcional ao número de L3 deverão ser realizados para verificar se a densidade larval é fator determinante na atuação do fungo bem como se a dosagem na aplicação poderia estar associada ao número de OPG ou de L3 na pastagem.

Estudos envolvendo esta cepa no controle biológico de nematóides de plantas também deverão ser realizados.